

Titre: Optimisation en ligne des expériences réalisées à l'aide de biocapteurs dont le principe de détection est la résonance plasmonique de surface
Title:

Auteur: Massinissa Si Mehand
Author:

Date: 2013

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Si Mehand, M. (2013). Optimisation en ligne des expériences réalisées à l'aide de biocapteurs dont le principe de détection est la résonance plasmonique de surface [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1151/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1151/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Gregory De Crescenzo, & Balasubrahmanyam Srinivasan
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

OPTIMISATION EN LIGNE DES EXPÉRIENCES RÉALISÉES À L'AIDE DE
BIOCAPTEURS DONT LE PRINCIPE DE DÉTECTION EST LA RÉSONANCE
PLASMONIQUE DE SURFACE

MASSINISSA SI MEHAND

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR

(GÉNIE CHIMIQUE)

JUIN 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

OPTIMISATION EN LIGNE DES EXPÉRIENCES RÉALISÉES À L'AIDE DE
BIOCAPTEURS DONT LE PRINCIPE DE DÉTECTION EST LA RÉSONANCE
PLASMONIQUE DE SURFACE

présentée par : SI MEHAND Massinissa

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. SRINIVASAN Bala, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

M. DUCHESNE Carl, Ph. D., membre

DÉDICACE

« Cherchez le savoir même en Chine »

Mohamed 570-632

À la mémoire de mon père.

À la mémoire de mon ami M'heni et au 125

victimes du printemps noir assassinées à la fleur de l'âge.

Vous resterez pour toujours dans nos cœurs.

Thanmirth

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier mes directeurs de recherche, Gregory De Crescenzo et Bala Srinivasan, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Leurs enseignements, leurs aides et leurs encouragements constants pendant la thèse m'ont été d'un grand réconfort. Leur supervision bienveillante, leur rigueur et leurs expertises m'ont permis d'avancer et de mener à bien mon projet de doctorat. Travailler sous leur supervision était un réel plaisir et j'ose espérer collaborer avec eux dans le futur.

Je tiens à remercier les différentes personnes qui sont intervenues de près ou de loin dans le cadre de ce projet et avec qui j'ai eu l'occasion de sympathiser : Benoit, Cyril, Ron, Frédéric, Samantha, Charles, July, Nesrine, Lyne, Roberto, Guillaume, Cédric, Atefeh, Zahrah, Alex, Ines, Yuan et Jin Kuin. Merci pour avoir créé un cadre de travail des plus agréable.

Le doctorat est également une aventure humaine qui m'a permis de rencontrer des personnes formidables avec qui de forts liens ont pu être tissés. Merci en particuliers à mon frère et ma sœur d'adoption Hamid et Tatiana qui m'ont toujours soutenu moralement, merci à : Louis, Bobby, Radia, Audrey, Samin, Hilda, Odile, Éric, Maud, Brendan, Frank, Dri, Tati, Carlos, André, Ju, Tiago et Claressa. Merci à ma petite princesse vietnamienne, Mai Linh.

Pour terminer, je voudrai remercier mon frère Ouahib qui a donné sans compter pour mon bien être. Merci à ma mère de m'avoir toujours encouragé et poussé à apprendre. J'aimerais remercier Vinh Kim pour son soutien, sa patience et ses conseils sans lesquels je ne serai pas où je suis aujourd'hui, je le remercie de m'avoir ouvert les portes de sa maison et de m'avoir donné

la chaleur d'un foyer familiale dans un pays étranger. Enfin, merci à Celso pour ses encouragements, pour avoir été là dans les moments difficiles... et tout simplement, merci à lui pour son amour.

RÉSUMÉ

Durant les deux dernières décennies, les biocapteurs utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR) à des fins de détection se sont imposés comme une méthode de choix pour l'étude cinétique des interactions entre biomolécules. Ces biocapteurs sont reconnus pour leur fiabilité et leur robustesse lorsqu'utilisés pour identifier les constantes cinétiques qui régissent les interactions des molécules à l'étude. Afin d'intégrer cette technologie aussi tôt que possible dans le processus de découverte de nouveaux composés thérapeutiques, de nouveaux instruments SPR à haute vitesse de criblage ont été développés. Cependant la justesse des constantes cinétiques identifiées avec ces nouveaux instruments est faible comparativement aux biocapteurs SPR classiques. Avec ces derniers, une expérience cinétique traditionnelle implique l'immobilisation de l'une des deux molécules à la surface du biocapteur et l'injection de 5 à 10 échantillons de son partenaire biologique au dessus de la surface fonctionnalisée. Il a été prouvé que deux injections soigneusement choisies peuvent conduire à l'identification des constantes cinétiques de manière aussi fiable qu'en réalisant les 5 à 10 injections décrites précédemment. Fort de cette constatation, notre laboratoire a développé un algorithme basé sur une optimisation numérique sous contrainte et l'identification de paramètre pour choisir ces deux injections, et donc augmenter la vitesse de criblage des biocapteurs SPR.

Afin de réduire les temps de criblage de large bibliothèques de composés, nous avons développé une méthode publiée en 2012 dans *Journal of Molecular Recognition*, qui améliore les performances de l'algorithme d'optimisation. Cette méthode est basée sur l'injection

simultanée de deux composés sur une surface où leur partenaire biologique a été précédemment immobilisé. Le modèle cinétique proposé a été validé expérimentalement à l'aide d'un système biologique modèle très bien documenté dans la littérature. Ce système correspond aux interactions entre l'anhydrase carbonique (isozyme II) et plusieurs composés de faibles poids moléculaires. Une fois le modèle validé nous nous sommes intéressés à l'optimisation de cette méthode. L'algorithme d'optimisation mis en place se base sur une première injection non optimisée de chacun des composés pris séparément. Les constantes cinétiques calculées sont alors utilisées pour déterminer les injections optimales à réaliser en combinant les deux composés. La mise en œuvre expérimentale de cet algorithme nous a permis de réduire de façon significative le temps d'expérience et la consommation de matériels par un facteur supérieur à 2,6 et 3,3 respectivement.

L'introduction de cette méthode a cependant soulevé des questionnements car des écarts de l'ordre de 17 % sur les paramètres cinétiques (lorsque comparés à ceux déterminés avec la méthode classique) avaient été observés. Bien qu'acceptables, ces déviations se trouvent être supérieures aux déviations rapportées pour deux expériences classiques entièrement indépendantes. Nous avons alors émis l'hypothèse que la source de ce biais résidait dans le fait que l'incrément de l'indice de réfraction des molécules de faible poids moléculaire, et par ricochet le signal SPR associé, peut varier grandement d'une molécule à l'autre. Ce phénomène ne pose aucun problème quand le mode expérimental classique est adopté avec des biocapteurs SPR puisqu'un seul composé est injecté. Cependant, pour éviter tous biais sur les constantes cinétiques déterminées lorsque deux composés sont injectés simultanément, le signal enregistré par l'instrument doit être analysé en pondérant la contribution de chacun des composés en fonction de l'incrément de l'indice de réfraction qui lui est propre. Partant de ce nouveau constat, nous avons

construit un modèle qui décrit parfaitement les interactions. En effet, l'analyse de onze cas expérimentaux différents avec notre nouveau modèle a montré que les déviations sur les constantes cinétiques étaient inférieures à 10 %, rejoignant ainsi les déviations observées entre expériences classiques indépendantes. Nos résultats sont résumés dans un manuscrit soumis au journal *Analytical Biochemistry*.

Les algorithmes d'optimisation développés dans notre laboratoire se sont avérés très efficaces pour augmenter la vitesse de criblage des biocapteurs SPR: ils réduisent drastiquement le temps d'expérience et la consommation de matériel. Ces algorithmes sont construits pour des interactions décrites par un modèle cinétique simple (modèle de Langmuir). Cependant, ce modèle n'est pas applicable à toutes les interactions puisqu'il n'inclut pas une limitation potentielle des cinétiques biologiques par transfert de masse. Cette limitation a été rapportée maintes fois lorsque les cinétiques biologiques sont rapides. Ainsi, si un modèle simple est utilisé quand l'interaction est influencée par la limitation par transfert masse, les constantes cinétiques identifiées sont biaisées. Dans le cinquième chapitre de cette thèse, nous avons présenté une méthode visant à minimiser la durée des expériences menées avec les biocapteurs SPR tout en choisissant le modèle approprié qui décrit l'interaction. La méthode proposée évite la détermination de constantes cinétiques biaisées tout en minimisant la collecte de données inutiles. Nos résultats, soumis au *Journal of Molecular Recognition* démontrent que cet algorithme ne rallonge pas de façon significative le temps d'expérience lorsque comparé à l'algorithme d'optimisation initial basé sur un modèle cinétique simple uniquement.

ABSTRACT

Within the last two decades, surface plasmon resonance - based biosensor experiments (SPR) for detection became a method of choice for the study of interaction between biomolecules. These biosensors are well known for their robustness and reliability when used to identify the kinetic parameters of interacting molecules. In effort to integrate this technology as early as possible in the process of drug discovery, new high throughput instruments were developed. However the confidence on the identified kinetic parameters with these tools is poor when compared to the classical SPR biosensors. A classical SPR experiment implies the immobilisation of one of the interacting molecules at the surface of the biosensors and the injection of 5 to 10 samples of the biological partner over the functionalized surface. It has been proven that two injections carefully chosen can allow the identification of kinetic parameter with a comparable confidence to an experiment with 5 to 10 injections. Based on this observation, our laboratory developed an algorithm based on numerical optimization under non-linear constraint and parameter identification to choose these two injections to improve the throughput of the SPR biosensors.

To improve the screening of large library compounds, we developed a method published in 2012 in the *Journal of Molecular Recognition*, that improves the performances of the optimization algorithm. This method is based on simultaneous injection of two compounds through a surface where their binding partner has been previously immobilized. The proposed kinetic model was experimentally validated by well-documented biological system in the literature. This system corresponds to interactions between the carbonic anhydrase isozyme II

(CAII) and its various low molecular weight inhibitors. Once the model validated we optimized the method. The proposed algorithm is based in on a first non-optimized injection of each analyte separately. The computed kinetic parameters are then used to predict optimal injection to perform by injecting the analytes simultaneously. The experimental implementation of this algorithm reduces significantly the experimental time and material consumption by factor superior to 2.6 and 3.3 respectively.

However, the introduction of this method raised some interrogations because some observed deviations on kinetic parameters were about 17 % (when compared to those identified with a classical method). Although acceptable, such a deviation is higher than that reported for independent duplicates, i.e. less than 10 %. We assumed that the source of this error could be the fact that the refractive index increment (RII) varies widely from a molecule to an other in case of low molecular weight compounds. This phenomenon does not influence the classical experiments because only one compound is injected. Whereas, to avoid any error in the kinetic parameter when two compounds are injected simultaneously, the signal must be weighted by the contribution of each compound in function of its own RII. Based on this assumption, we constructed a model that describes perfectly the interaction. Indeed, the analyze of eleven different experimental cases with this model shows that the deviations on kinetic parameters are inferior to 10%, as it is observed for independent classical experiments. Our results are submitted to the journal *Analytical Biochemistry*.

The algorithms developed in our laboratory are a efficient to improve the throughput of the SPR biosensors: they reduce drastically the experimental time and material consumption. These algorithms are designed for interaction following a simple kinetic model. However, this model is not applicable for all the interactions, as it does not include a potential mass transfer

limitation. This limitation takes place when the kinetics are fast. Indeed, if the simple model is used when the interaction is mass transfer limited than the identified kinetic parameters will be biased. In the fifth chapter of this thesis, we presented a method to reduce the experimental time of SPR biosensors while choosing the more appropriate model for the interaction under study. The proposed method avoids biased kinetic parameter and unnecessary data collection. Our results, submitted to the *Journal of Molecular Recognition* show that this algorithm does not extend significantly the experimental time when compared to the initial algorithm of optimization based on a simple model only.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
LISTE DES ANNEXES	XXIII
INTRODUCTION.....	1
MOTIVATION	1
PROBLÉMATIQUE	3
OBJECTIF PRINCIPAL	4
OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	4
STRUCTURE DE LA THÈSE	5
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	6
1.1 LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE MESURE DES CONSTANTES CINÉTIQUES	6
1.2 COMPARAISON DES DIFFÉRENTES MÉTHODES	10
1.3 LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE	11
1.3.1 SPR : DÉFINITION ET PRINCIPE DE DÉTECTION	12
1.3.2 DIFFÉRENTES TECHNOLOGIES COMMERCIALISÉES.....	16

1.4	MISE EN ŒUVRE DE LA SPR POUR LA DÉTERMINATION DES CONSTANTES CINÉTIQUES	21
1.4.1	LA SURFACE DU BIOCAPTEUR	22
1.4.2	IMMOBILISATION COVALENTE.....	24
1.4.3	LE COUPLAGE PAR LES LIAISONS AMINES.....	25
1.4.4	AUTRES STRATÉGIES D'IMMOBILISATION COVALENTE UTILISANT LA FONCTION THIOL.....	28
1.4.5	SURFACE DE RÉFÉRENCE	30
1.4.6	LE SENSORGRAMME ET L'APPROCHE EXPÉRIMENTALE CLASSIQUE	32
1.5	MODÉLISATION DES INTERACTIONS.....	38
1.5.1	MODÈLE SIMPLE	39
1.5.2	MODÈLE SIMPLE AVEC LIMITATION PAR TRANSFERT DE MASSE :	40
1.6	IDENTIFICATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES	42
1.6.1	DIFFÉRENTES MÉTHODES DE TRAITEMENT DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES.....	44
1.6.2	CRITIQUE DES MÉTHODES	46
1.7	MÉTHODES DE MINIMISATION	47
1.7.1	MÉTHODE DE MINIMISATION LOCALE	51
1.7.2	MINIMISATION GLOBALE.....	54
1.7.3	OPTIMISATION SOUS CONTRAINTES NON-LINÉAIRES	56
1.8	ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES PARAMÈTRES ESTIMÉS	62
1.9	PLANIFICATION OPTIMALE DES EXPÉRIENCES	65
	CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT.....	68
	CHAPITRE 3 AUGMENTATION DE LA VITESSE DE CRIBLAGE DE RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE PAR INJECTION DE PLUSIEURS ANALYTES	72
3.1	PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	72
3.2	INCREASING THROUGHPUT OF SURFACE PLASMON RESONANCE-BASED BIOSENSORS BY MULTIPLE ANALYTE INJECTIONS.....	73
3.2.1	ABSTRACT	74
3.2.2	INTRODUCTION	75
3.2.3	MATERIALS AND METHODS	83

3.2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	86
3.2.5 CONCLUSION.....	95
3.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	95
3.2.7 REFERENCES	96
CHAPITRE 4 SURFACE PLASMON RESONANCE SIGNAL IS NOT PROPORTIONAL TO MASS FOR SMALL MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS	99
4.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	99
4.2 SURFACE PLASMON RESONANCE SIGNAL IS NOT PROPORTIONAL TO MASS FOR SMALL MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS	100
4.2.1 ABSTRACT	101
4.2.2 INTRODUCTION	102
4.2.3 MATERIALS AND METHODS	104
4.2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	107
4.2.5 CONCLUSION.....	117
4.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	117
4.2.7 REFERENCE	118
CHAPITRE 5 OPTIMISATION DE LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE AVEC DISCRIMINATION DE MODÈLE.....	121
5.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	121
5.2 ON-LINE KINETIC MODEL DISCRIMINATION FOR OPTIMIZED SURFACE PLASMON RESONANCE EXPERIMENTS	122
5.2.1 ABSTRACT	123
5.2.2 INTRODUCTION	124
5.2.3 MATERIALS AND METHODS	133
5.2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	135
5.2.5 ACKNOWLEDGEMENTS.....	146
5.2.6 REFERENCES	147
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE	150
6.1 MÉTHODE D'INJECTION DE PLUSIEURS ANALYTES :	150

6.2 OPTIMISATION AVEC DISCRIMINATION DE MODÈLE DE LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE:	156
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	162
7.1 CONCLUSION	162
7.2 RECOMMANDATIONS.....	164
BIBLIOGRAPHIE	166
ANNEXE 1 – ESTIMATION DE LA CONCENTRATION D’UN ANALYTE AVEC LES BIOCAPTEURS UTILISANT LE PHÉNOMÈNE DE RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE PAR LA TECHNIQUE D’IDENTIFICATION DE PARAMÈTRES.....	175
PRÉSENTATION DE L’ARTICLE	175
ESTIMATION OF ANALYTE CONCENTRATION BY SURFACE PLASMON RESONANCE-BASED BIOSENSING USING PARAMETER IDENTIFICATION TECHNIQUES.....	176
ABSTRACT	177
INTRODUCTION.....	178
MATERIALS AND METHODS	180
RESULTS AND DISCUSSION	181
CONCLUSION	187
REFERENCES.....	188

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Exemples d'application des différents biocapteur SPR, SAW et QCMB pour l'étude de différentes interactions.....	7
Tableau 1.2. Comparaison des performances de la SPR versus QCMB.....	8
Tableau 1.3. Liste des principaux manufacturiers de biocapteurs SPR, des instruments et des sites web.....	17
Table 3.1. Kinetic constants for all the case-study interactions determined with Biaevaluation 1.1.1 for the classical method and with an in-house software for multiple analyte injections.....	88
Table 3.2. Kinetic constants for all the case study interactions by the different optimized approaches (classical and multiple analyte injections) determined with an in-house software.....	91
Table 3.3. Experimental times and material consumptions.....	94
Table 4.1. Kinetic parameter deviation related to the use of the different models.....	114
Table 5.1. Direct optimization with the MTL model.....	137
Table 5.2. Simulations results related to approaches 1 and 2.....	140

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Principe d'opération d'un biocapteur.....	9
Figure 1.2 : Illustration du phénomène de résonance plasmonique de surface.....	13
Figure 1.3 : Présentation schématique du principe de fonctionnement des biocapteurs SPR.....	15
Figure 1.4 : Les différentes géométries et interconnexions entre cellules pour les différents biocapteurs commercialisés par BIACORE.....	20
Figure 1.5 : La nanoarchitecture d'une surface SPR type.....	23
Figure 1.6 : Différentes technologies d'immobilisation.....	27
Figure 1.7 : Couplage thiol en utilisant la fonction maléimide.....	29
Figure 1.8 : Préparation des données SPR avant analyse - Méthode de double-référencement.....	31
Figure 1.9: Schéma d'une expérience classique.....	33
Figure 1.10 : Exemple de titration en série.	37
Figure 1.11 : Maximum local et global d'une fonction objectif.....	48
Figure 1.12 : Illustration de la routine d'estimation des paramètres.....	50
Figure 1.13 : L'algorithme simplex pour un problème d'optimisation à deux dimensions.....	55
Figure 1.14 : Pénalité logarithmique.	59
Figure 1.15 : Schematisation de l'algorithme utilisé pour la résolution des problèmes d'optimisation sous contraintes non-linéaires.....	61

Figure 3.1. Classical kinetic analysis and multiple analyte injection analyses of CBS, BDS, and sulfanilamide binding to CAII surfaces using a BIACORE T100 biosensor.....	89
Figure 3.2. Optimized classical experiments and optimized multiple analyte injections for kinetic analysis of CBS, BDS and sulfanilamide binding to CAII surfaces using a BIACORE T100 biosensor.....	92
Figure 4.1. Experimental strategy for multiple analyte injection experiments.....	106
Figure 4.2. Observed saturation values as a function of drug molecular weight.....	109
Figure 4.3. Kinetic analysis of multiple analyte injection experiments.....	116
Figure 5.1. Algorithm corresponding to the 'optimization with model discrimination' approach.....	132
Figure 5.2. Simulated sensorgrams corresponding to the non-optimized data used in this manuscript.....	136
Figure 5.3. Classical kinetic analysis of CBS, Sulfanilamide, BDS and acetazolamide binding to CAII surfaces.....	142
Figure 5.4. Experiments performed according to approach 2 for kinetic analysis of CBS, sulfanilamide, BDS and acetazolamide binding to CAII surfaces using a BIACORE T100 biosensor.....	145

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Analyte
AB, CB	Complexes analyte/ligand
ADN	Acide désoxyribonucléique
Anti-CEA	Anti-antigène carcino-embryonnaire
anti-IgG	Anti-immunoglobulin G
B	Ligand
BDS	1,3-benzenedisulfonamide
bPrP	Protéine prion bovine
C	Analyte
CAII	Carbonic anhydrase isozyme II
CBS	4-carboxybenzenesulfonamide
CEA	Antigène carcino-embryonnaire
CM	Carboxyméthylé
C_T	Concentration de l'analyte
C_A , C_c	Concentrations des analytes au voisinage de la surface où la réaction a lieu
C_{AB} , C_{CB}	Concentrations of the complexes AB and CB
C_{max}	Concentration maximale
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNSA	5-dimethyl-amino-1-naphthalene-sulfonamide
EDC	Hydrochlorure de 1-éthyl-3carbodiimide

EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCH	N-[ϵ -maleimidocaproic acide]-hydrazide
ErbB-1	Epidermal growth factor receptor
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
g_i	Contraintes non linéaires d'inégalité
h_k	Contraintes non linéaires d'égalité
IgG	Immunoglobulin G
J, f	Fonctions objectifs
k_a	Constante cinétique d'association et de dissociation
k_d	Constante cinétique de dissociation
k_M	Coefficient de limitation par transfert de masse
M_i, P_i	Nombre de points expérimentaux dans le sensorgramme i
MTL	Mass transfer limitation
M_1, M_2	Molecular weights of A and C
N	Nombre de sensorgrammes
NHS	N-hydroxysuccinimide
ODE	Equations différentielles ordinaires
PBS	Phosphate buffer saline
PEG	Polyéthylène Glycol
QCMB	Quartz Crystal Microbalance
R, R_1, R_2	Signal SPR
R_A	Facteur correctif

RII	Refractive index increment
R_{AB}	Signal enregistré correspondant au complexe AB
R_{\max}	Signal maximum d'analyte
R_{exp}^i	Signal mesuré
R_{pred}^i	Signal prédit par le modèle
R_0	Valeur du dernier point de la phase d'injection d'analyte
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R_{TC}	Correction factor
RU	Resonance unit
$s(x^{(k)}), s^{(k)}$	Direction de recherche.
SAW	Surface Acoustic Wave
Sulf	Sulfanilamide
SPR	Résonance plasmonique de surface
Sulfo-GMBS	N[γ -maleimidobutyryloxy]sulfo-succinimide ester
Trx#10	Thioredoxin peptide
TNF α	Tumor necrosis factor α
t_a	Temps d'injection
t_d	Temps de dissociation
t_a, t_{a1}, t_{a2}	Temps d'association
t_d, t_{d1}, t_{d2}	Temps dissociation
T_{\max}	Temps maximal allouée à l'expérience.
x^*	Point optimal
x^k	kième estimation de la solution x^*
$x_i^{(l)}$ et $x_i^{(u)}$	Bornes inférieures et supérieures.

$x(0)$	Point initial
$x(t)$	Point générique
$x(T)$	Meilleure estimation de l'optimum x^*
$x(t), t=1,2,3,\dots T$	Points de la régression vers l'optimum.
Ω	Terme de pénalité
ρ	Constante de proportionnalité
σ	Ecart type du bruit
β_a, β_d	Erreurs désirées sur les paramètres
η_{max}	Quantité d'analyte maximale
λ	Vecteur paramètres
$\alpha^{(k)}$	Longueur du pas d'optimisation
∇f	Gradient de la fonction f
$\nabla^2 f = H$	Hessien de la fonction f
ζ_j	Confidence
1E5	Olfactory receptor antibody

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 ESTIMATION DE LA CONCENTRATION D'UN ANALYTE AVEC LES BIOCAPTEURS UTILISANT LE PHÉNOMÈNE DE RÉSONANCE PLASMIQUE DE SURFACE PAR LA TECHNIQUE D'IDENTIFICATION DE PARAMÈTRES.....	175
--	-----

INTRODUCTION

Motivation

L'étude des interactions entre molécules est d'une importance capitale dans différents domaines des sciences biologiques, notamment en biochimie et en ingénierie des protéines ainsi que dans le domaine pharmaceutique lors de la mise au point ou de l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques. De nos jours, lorsque l'une des deux espèces est une protéine, l'étude de son interaction avec un partenaire biologique comporte deux grands volets. Le premier se concentre sur la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine alors que le second vise à décrire le système composé de ces molécules en interaction d'un point de vue thermodynamique et cinétique. Connaître la structure de deux macromolécules seules et en interaction permet de caractériser leur conformation individuelle, les changements tridimensionnels induits par l'interaction et la nature des sites de liaison. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la cristallographie aux rayons X sont deux méthodes utilisées pour déterminer la structure des macromolécules (Deo *et al.*, 2001; Kozlov *et al.*, 2002; Kozlov *et al.*, 2001). Cependant la cristallographie aux rayons X ne permet que de saisir une image figée dans le temps, en délaissant des paramètres physiques importants tels que les cinétiques d'interaction et les constantes thermodynamiques; la RMN peut permettre la collecte de données cinétiques qualitatives mais la technique est limitée aux petites macromolécules. Les études structurales doivent donc être complétées par une approche visant à quantifier les dynamiques moléculaires, soit mesurer les constantes cinétiques et thermodynamiques afin de valider l'importance de certains résidus ou de domaines d'interactions (Cannon *et al.*, 2004b; De

Crescenzo *et al.*, 2005; Kozlov *et al.*, 2004) ou encore afin d'identifier d'éventuels ligands naturels (Lim *et al.*, 2006).

L'étude de l'interaction entre deux molécules (protéine-protéine, protéine-lipide, protéine-molécule de faible poids moléculaire ...) passe donc par la détermination de la constante thermodynamique d'association ou, mieux encore, par la détermination des constantes cinétiques. L'évaluation des cinétiques d'interaction semble en effet plus pertinente que la connaissance de la constante thermodynamique puisque dans le cas particulier des systèmes biologiques, ceux atteignant l'équilibre sont souvent nécrotiques. De surcroît, la constante thermodynamique peut être calculée à partir des constantes cinétiques. La mesure des cinétiques permet donc de caractériser les interactions entre biomolécules, en termes de force de liaison et de stabilité des complexes associés (Karlsson and Larsson 2004; Rich and Myszka 2006; Rich and Myszka 2001). D'autre part, la constante thermodynamique seule n'est pas suffisante pour pouvoir décrire le phénomène biologique ayant lieu (Krogsgaard *et al.*, 2003) et la caractérisation de l'interaction d'un point de vue cinétique peut être nécessaire afin d'expliquer le mécanisme biologique (Lenferink *et al.*, 2000; O'Connor-McCourt *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 1993). En effet, les différences cinétiques entre une molécule donnée et plusieurs de ses partenaires biologiques peuvent se compenser pour donner des constantes thermodynamiques très similaires (De Crescenzo *et al.*, 2008b; Lenferink *et al.*, 2000). Ce cas particulier a été documenté par Lenferink *et al.*, 2000 lors de l'étude des interactions entre le récepteur ErbB-1 et plusieurs de ses ligands (naturels et artificiels). Les activités biologiques très différentes de ces ligands (agoniste ou super-agoniste) ne pouvaient pas être expliquées par leur constante thermodynamique d'association avec leur récepteur ErbB-1 puisque très similaires (Kramer *et al.*, 1994). Une analyse cinétique des interactions a cependant montré que les ligands s'associaient plus rapidement

au récepteur (et donc se dissociant plus rapidement pour donner une constante thermodynamique similaire) étaient les meilleurs agonistes. Plusieurs études d'interaction entre peptides et protéines (Andersson and Hamalainen 1999; Choulier *et al.*, 2002; Khalifa *et al.*, 2001), protéine et protéine (De Genst *et al.*, 2002; Markgren *et al.*, 2002) ont montré que différentes parties d'une molécule peuvent affecter la cinétique d'association ou de dissociation. Markgren et collègues (Markgren *et al.*, 2002) ont rapporté que l'observation de la constante thermodynamique uniquement ne suffit pas à expliquer la force d'une liaison entre deux protéines.

Cependant, la détermination des constantes cinétiques est une tâche laborieuse et coûteuse. Réduire la durée de l'expérimentation et son coût avancera la recherche dans le domaine des sciences du vivant et dans le domaine pharmaceutique, en permettant une identification rapide et efficace des paramètres biocinétiques. Ceci passe invariablement par une planification expérimentale optimale. C'est dans cet esprit que s'axe notre travail de recherche.

Problématique

La génération de données SPR de grande qualité, c'est à dire permettant de caractériser les cinétiques d'interaction avec une bonne confiance, est une étape encore délicate de nos jours car, dans la grande majorité des cas elle ne repose que sur le savoir-faire de l'expérimentateur qui choisit les conditions de travail (plage des concentrations et temps d'injection). L'expérimentation classique n'est pas non plus compatible avec de hautes vitesses de criblage qui permettraient d'intégrer les techniques SPR dès les premières étapes d'identification de nouveaux agents thérapeutiques. L'approche expérimentale développée par De Crescenzo *et al.* 2008b a répondu partiellement à ce besoin en permettant l'optimisation en ligne des expériences et donc de réduire drastiquement le temps d'expérience et la consommation de matériel. La méthode proposée est cependant limitée à l'utilisation d'un modèle cinétique simple qui ne tient pas compte de la

limitation par transfert de masse alors que cette dernière peut influencer grandement les constantes cinétiques dans le cas d'interactions biologiques rapides. D'autre part, les gains en temps et matériel obtenus, quoique satisfaisants ne permettent pas d'atteindre, avec des appareils classiques, les vitesses de criblage obtenues avec les biocapteurs SPR dédiés à cette tâche (même si la caractérisation cinétique des interaction n'est pas aussi bonne avec ces biocapteurs).

Objectif Principal

Dans ce contexte, le défi auquel s'attèle cette thèse de doctorat est de concilier deux objectifs implicitement opposés, à savoir, gagner du temps pour augmenter la vitesse de criblage, et prendre en compte les interactions moléculaires rapides pour lesquelles la limitation par transfert de masse n'est pas négligeable.

Objectifs Spécifiques

Afin d'atteindre cet objectif principal, plusieurs objectifs spécifiques ont été formulés :

1. Développer et valider un plan expérimental permettant d'injecter plusieurs analytes simultanément (gain de temps);
2. Développer et valider un algorithme d'optimisation en ligne applicable à l'injection simultanée de plusieurs ligands (gain de temps);
3. Construire et valider un algorithme d'optimisation qui permet de choisir le modèle cinétique qui décrit l'interaction (entre un modèle simple et un modèle prenant en compte la limitation par transfert de masse).

Structure de la thèse

Cette thèse est constituée de sept chapitres. Le premier chapitre consiste en une revue de littérature décrivant les différents outils expérimentaux utilisés pour la détermination des constantes cinétiques, en mettant l'accent sur l'identification des constantes cinétiques par l'utilisation des biocapteurs dont le principe de détection est basé sur la résonance plasmonique de surface. Le chapitre 2 décrit les objectifs et l'organisation générale du document. Celui-ci sera suivi du chapitre 3 présentant un article scientifique publié dans le cadre de cette thèse. Ce dernier présente une nouvelle méthode expérimentale qui augmente considérablement la vitesse de criblage de la technique SPR en injectant deux composés simultanément au lieu d'une approche séquentielle. Les chapitres 4 et 5, correspondent à des articles soumis pour publication. Le chapitre 4 raffine la modélisation de la méthode basée sur l'injection simultanée de deux composés; il démontre notamment que contrairement à l'idée reçue et largement acceptée, le signal SPR n'est pas directement proportionnel à l'accumulation de la masse sur la surface du biocapteur dans le cas des composés de faibles poids moléculaire. Grâce aux conclusions de cette étude, le modèle utilisé dans le chapitre 3 est adapté afin d'être applicable à un large éventail de molécules de faible poids moléculaire. Le chapitre 5 présente enfin une méthode qui permet de réduire le temps expérimental tout en choisissant le modèle cinétique approprié pour une détermination fiable et rapide des constantes cinétiques grâce aux biocapteurs SPR. Finalement, les chapitres 6 et 7 correspondent respectivement à une discussion générale du travail effectué ainsi qu'à une conclusion et à l'émission de recommandations.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les différentes méthodes de mesure des constantes cinétiques

Il existe plusieurs méthodes de mesure des cinétiques d'interaction entre macromolécules. Nous pouvons cependant les diviser en deux grandes familles. La première comprend l'ensemble des méthodes 'tout en solution', soit celles qui font appel à la technique du '*stopped flow*'. Dans cette approche, de petits volumes de solutions contenant chacun les macromolécules dont on veut évaluer l'interaction sont rapidement acheminés de deux seringues dans un mélangeur afin d'initier l'interaction. Les volumes injectés sont limités par une seringue d'arrêt (d'où le terme '*stopped-flow*'). Cette technologie permet d'obtenir des temps de mélange de l'ordre de la milliseconde mais cette approche nécessite le plus souvent le marquage de l'une ou des deux espèces afin de détecter l'interaction, par exemple par 'Förster Resonance Energy Transfer' (FRET). De manière similaire, afin de suivre la dissociation des complexes formés, les deux solutions correspondant au tampon et au complexe macromoléculaire, sont injectées (Day *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 1996; Slepnev *et al.*, 2006). La sensibilité de la technique est directement liée au(x) détecteur(s) employé(s) (FRET, dichroïsme circulaire, absorbance ...).

La deuxième grande famille de méthodes de caractérisation cinétique comprend l'ensemble des approches expérimentales pour lesquelles l'interaction a lieu à la surface d'un biocapteur (Figure 1.1). Un biocapteur peut être défini comme étant un outil analytique incorporant un bio-récepteur intégré à un transducteur. Leur mode de fonctionnement est basé sur la détection de

l'interaction entre une molécule en solution - l'analyte - et son partenaire biologique préalablement immobilisé sur un support compatible - le ligand (Figure 1.1) (Velasco-Garcia and Mottram 2001). L'interaction entre les deux partenaires engendre un changement des propriétés physico-chimiques. Ce changement sera détecté, et pourra être quantifié, par le transducteur. Le but étant de produire un signal qui est proportionnel en magnitude, ou en fréquence, à la concentration du complexe ligand/analyte qui se forme à la surface (Powner and Yalcinkaya 1997). Dépendamment du signal de transduction, les biocapteurs peuvent être divisés en plusieurs groupes, à savoir ceux dont le principe est électrochimique, optique, thermométrique, piézoélectrique ou magnétique. Un survol rapide de la littérature montre que, durant les deux dernières décennies la popularité des biocapteurs n'a cessé d'augmenter. Parmi ces derniers, ceux qui exploitent la vibration des cristaux de quartz comme les microbalances à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance – QCMB), le phénomène d'ondes acoustiques de surface (Surface Acoustic Wave – SAW) ou de Résonance Plasmonique de Surface (Surface Plasmon Resonance – SPR) sont les plus fréquemment utilisés en recherche, tableau 1.1.

Tableau 1.1. Exemples d'application des différents biocapteur SPR, SAW et QCMB pour l'étude de différentes interactions.

Interactions	SPR	SAW	QCMB
Anticorps/Antigène	Protéine prion bovine (bPrP)/ Anticorps monoclonal, 1E5 (Bich <i>et al.</i> , 2008a)	anti-IgG/IgG (Lange <i>et al.</i> , 2008)	Antigène carcino-embryonnaire (CEA) /anti-CEA(Chen and Tang 2007)
Peptide/Peptide/Protéine	K Coil E/ coil-tagué EGF (De Crescenzo <i>et al.</i> , 2008a)	Thiorédoxine/Trx#10 (Gronewold <i>et al.</i> , 2009)	GST-Grb2 SH2/ peptides <i>phosphotyrosyl</i> (Lung <i>et al.</i> , 2006)

Dans le cas de la plupart des QCMB, la sensibilité de ces instruments est de l'ordre du nanogramme (Tableau 1.2). Les biocapteurs utilisant la SAW comme technique de détection peuvent, quant à eux détecter des molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 1000 Daltons. La technologie SPR est la plus mature de ces trois méthodes de détection, tableau 1.2: elle sera détaillé dans les prochains paragraphes puisque notre étude vise à améliorer l'utilisation de biocapteurs SPR. Nous renvoyons le lecteur vers plusieurs revues afin d'explorer en détail les autres types de biocapteurs, soit *Biosens Bioelectron, Langmuir and Sensors et Actuators B: Chemical* pour les microbalances et pour la technologie SAW, soit *Biosens Bioelectron, Sensors (Basel)* et *analytical chemistry*.

Tableau 1.2. Comparaison des performances de la SPR versus QCMB (Biosensing-Instrument 2012)

	Limite de détection : masse/surface	Limite de détection : massique	Robustesse des analyses cinétiques	Volume des échantillons	Nature des surface	Multiple canaux
SPR	0.1 ng/cm ²	1 fg	Excellente	10 à 100 µl	Or sur verre	Mise en œuvre simple
QMB	1 ng/cm ²	1 ng	Difficile	50 à 200 µl	Or sur quartz	Mise en œuvre difficile

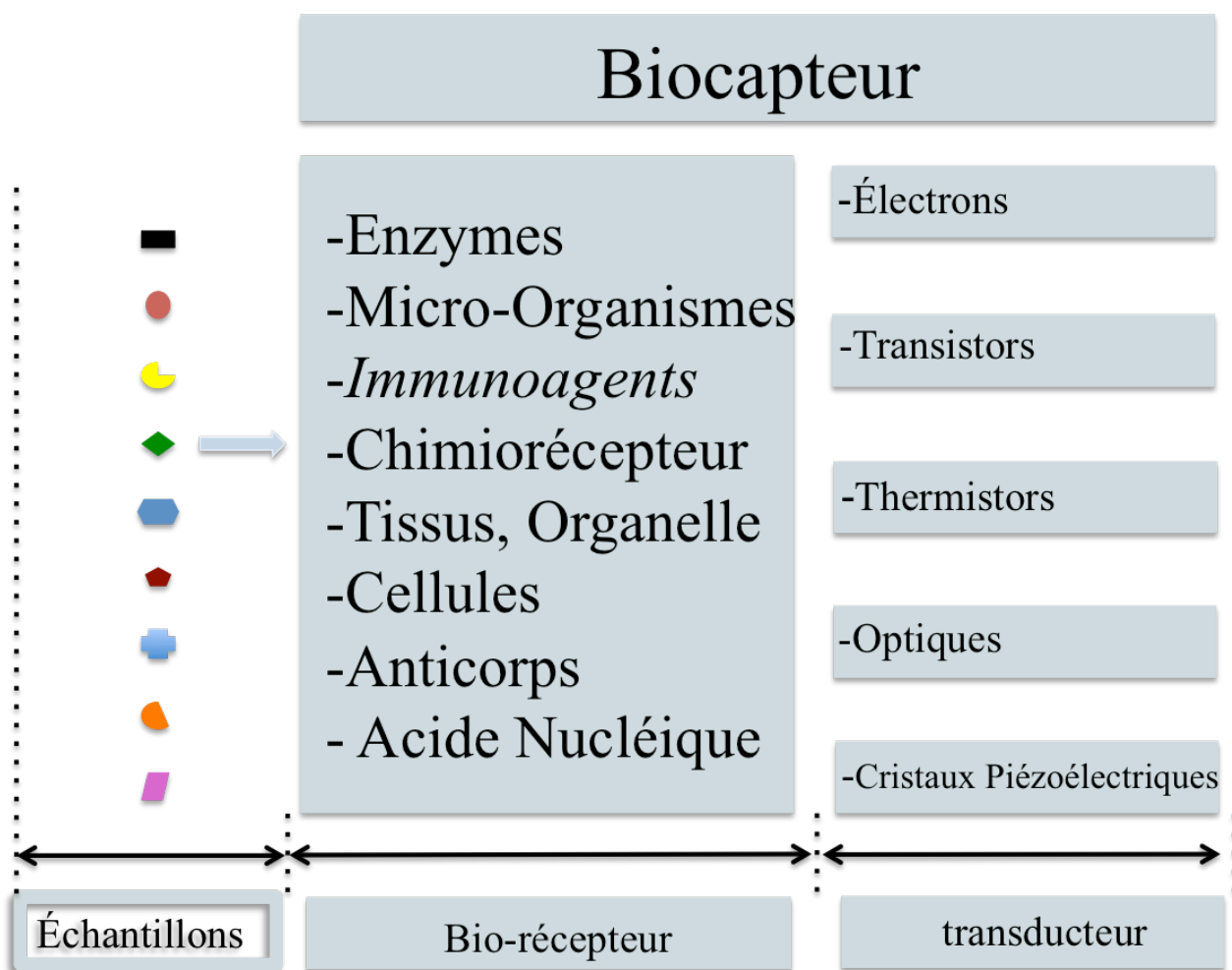


Figure 1.1 : Principe d'opération d'un biocapteur. Figure adaptée de (Powner and Yalcinkaya 1997)

1.2 Comparaison des différentes méthodes

Les biocapteurs SPR présentent plusieurs avantages par rapport aux instruments décrits plus haut (biocapteurs ou approches en solution). Ainsi le fait qu'ils ne nécessitent pas l'usage de marqueurs fluorescents ou radioactifs augmente grandement leur champ d'application - ainsi que la facilité de mise en œuvre des expériences – contrairement à l'utilisation de mélangeurs 'stopped-flow'. La plupart des biocapteurs SPR permettent aussi de suivre en temps réel les interactions à l'étude, ce qui mène à une caractérisation tant cinétique que thermodynamique avec ces instruments. De plus, les instruments les plus performants permettent de nos jours de suivre les interactions impliquant une grande variété de molécules allant des macromolécules (dont la masse moléculaire peut dépasser les 100 kDa) aux composés issus de la pharmacopée traditionnelle (dont la masse moléculaire peut être inférieure à 200 Da) (De Crescenzo *et al.*, 2008a).

Cette grande capacité de détection alliée à leur facilité d'emploi permet l'utilisation de ces biocapteurs pour la caractérisation de la grande majorité des systèmes biologiques, incluant la caractérisation des interactions entre des protéines: par exemple les systèmes anticorps-antigène (Candresse *et al.*, 2007), ligand-récepteur (Kelly *et al.*, 2007; Lortat-Jacob and Ricard-Blum 1997), des systèmes peptide-peptide (De Crescenzo *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2007), ou encore la détection des interactions entre un partenaire biologique immobilisé et des oligonucléotides (Di Primo and Lebars 2007), des petites molécules (Day *et al.*, 2002; Kernstock and Girotti 2007; Navratilova *et al.*, 2007), des mono- et poly-saccharides (Lortat-Jacob and Ricard-Blum 1997), (Hrtska *et al.*, 2007), les interactions entre protéines et lipides (Ito *et al.*, 2007), les interactions entre les différents composants de la matrice extracellulaire, l'injection de membranes, de virus entiers et même de cellules (Lortat-Jacob and Ricard-Blum 1997; Rich and Myszka 2008).

Enfin il est à noter que, bien que la validité des constantes cinétiques déduites des expériences SPR ait été questionnée (l'immobilisation d'un des deux partenaires limite son degré de liberté lorsque comparé à la situation où les deux molécules sont en solution ; l'immobilisation peut influencer la bioactivité etc ...), les études les plus récentes ont dissipé ces doutes. Il a en effet été démontré que, lorsque les expériences SPR sont correctement menées, les constantes cinétiques et thermodynamiques déterminées à partir de des biocapteurs SPR sont identiques à celles obtenues par des techniques 'tout en solution', à savoir une approche 'stopped flow' (pour les constante cinétiques) et la microcalorimétrie (pour la détermination des constantes thermodynamiques) (Day *et al.*, 2002; Myszka *et al.*, 2003; Navratilova *et al.*, 2007).

1.3 La résonance plasmonique de surface

La première observation du phénomène de la résonance plasmonique de surface a eu lieu en 1902. En envoyant une source de lumière blanche sur un réseau de diffraction en réflexion métallique, Wood remarqua une 'anomalie' : une fente noire dans le spectre réfracté (Bich *et al.*, 2008b; Homola 2006). Mais une explication complète du phénomène n'a été possible qu'en 1968 par Otto, Krestschmann et Raether. En 1983 Liedberg applique la SPR à l'étude des interactions entre biomolécules (Liedberg *et al.*, 1983). Depuis lors, l'intérêt pour cette méthode ne cesse d'augmenter, comme en témoigne le nombre croissant de publications où les biocapteurs SPR sont utilisés. Durant l'année 2007, 1179 articles utilisant la technique ont été publiés et presque 10 000 l'ont été dans les 12 années antérieures à 2007, ce qui correspond à une augmentation significative par rapport au début du millénaire (700 publications en 2001) (Rich and Myszka 2010; Rich and Myszka 2006; Rich and Myszka 2001)

1.3.1 SPR : Définition et principe de détection

La SPR est un phénomène physique qu'il est possible d'observer aisément (Figure 1.2). Si une lumière polarisée est dirigée à travers un prisme ayant une mince couche métallique à sa surface, la lumière sera réfléchi par le métal agissant comme un miroir. En changeant l'angle d'incidence et en observant l'intensité de la lumière dans le faisceau réfléchi, on remarque que l'intensité lumineuse passe par un minimum. À cet angle d'incidence, la lumière excite les électrons du métal ce qui produit le phénomène de résonance plasmonique de surface et se traduit par l'apparition d'une onde évanescente sur la surface du métal et donc par une diminution de l'intensité de la lumière réfléchi.

En effet, les photons de la lumière polarisée interagissent avec les électrons libres du métal, ces derniers absorbent l'énergie des photons et oscillent. Ceci entraîne la diminution de l'intensité de l'onde réfléchi (Bich *et al.*, 2008b; De Crescenzo *et al.*, 2008a; Englebienne *et al.*, 2003; Homola 2006; Nice and Catimel 1999).

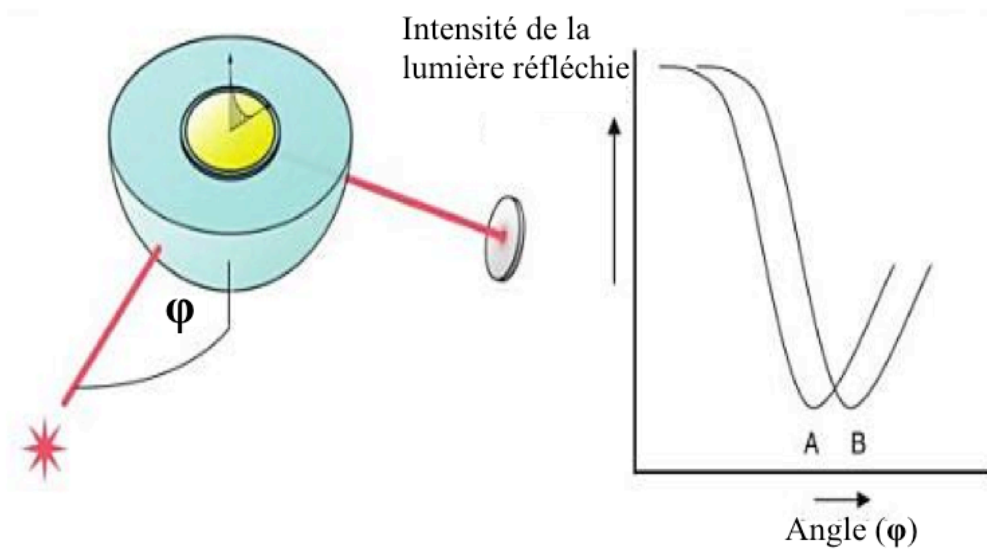


Figure 1.2 : Illustration du phénomène de résonance plasmonique de surface. Adapté de (Schasfoort and Tudos 2008).

L'angle qui correspond au minimum d'intensité est appelé l'angle de résonance. La valeur de cet angle dépend des indices de réfraction des milieux des deux côtés du métal. L'indice de réfraction du prisme reste inchangé, mais l'indice de réfraction à la surface libre du métal peut varier avec les caractéristiques physiques du milieu. Entre-autres, tout dépôt de matière sur la surface métallique entraîne un changement de l'angle de résonance directement relié à la quantité de matière déposée (Figure 1.3) (Englebiennne *et al.*, 2003; Schasfoort and Tudos 2008). Donc l'angle de résonance est relié à l'indice de réfraction à la proximité de la surface, et ce dernier est relié à son tour à l'accumulation de masse à la surface métallique. Le changement de l'angle de résonance peut être suivi en temps réel grâce à un détecteur optique (par exemple tableau de diodes) qui mesure le changement d'intensité lumineuse, cette variation d'angle est traduite en unité de résonance (RU). Si une protéine est fixée sur la surface métallique et son partenaire biologique injecté de façon continue au dessus de la surface, les deux molécules interagissent, conduisant ainsi à une accumulation de masse à la surface (dû au recrutement de l'espèce en solution). Cette accumulation entraîne alors une variation de l'angle correspondant au changement d'indice de réfraction induit par l'interaction entre les deux partenaires biologiques (Figure 1.3). Le suivi en temps réel permet l'étude des cinétiques de l'interaction (Baird and Myszka 2001; Englebiennne *et al.*, 2003; Lortat-Jacob and Ricard-Blum 1997).

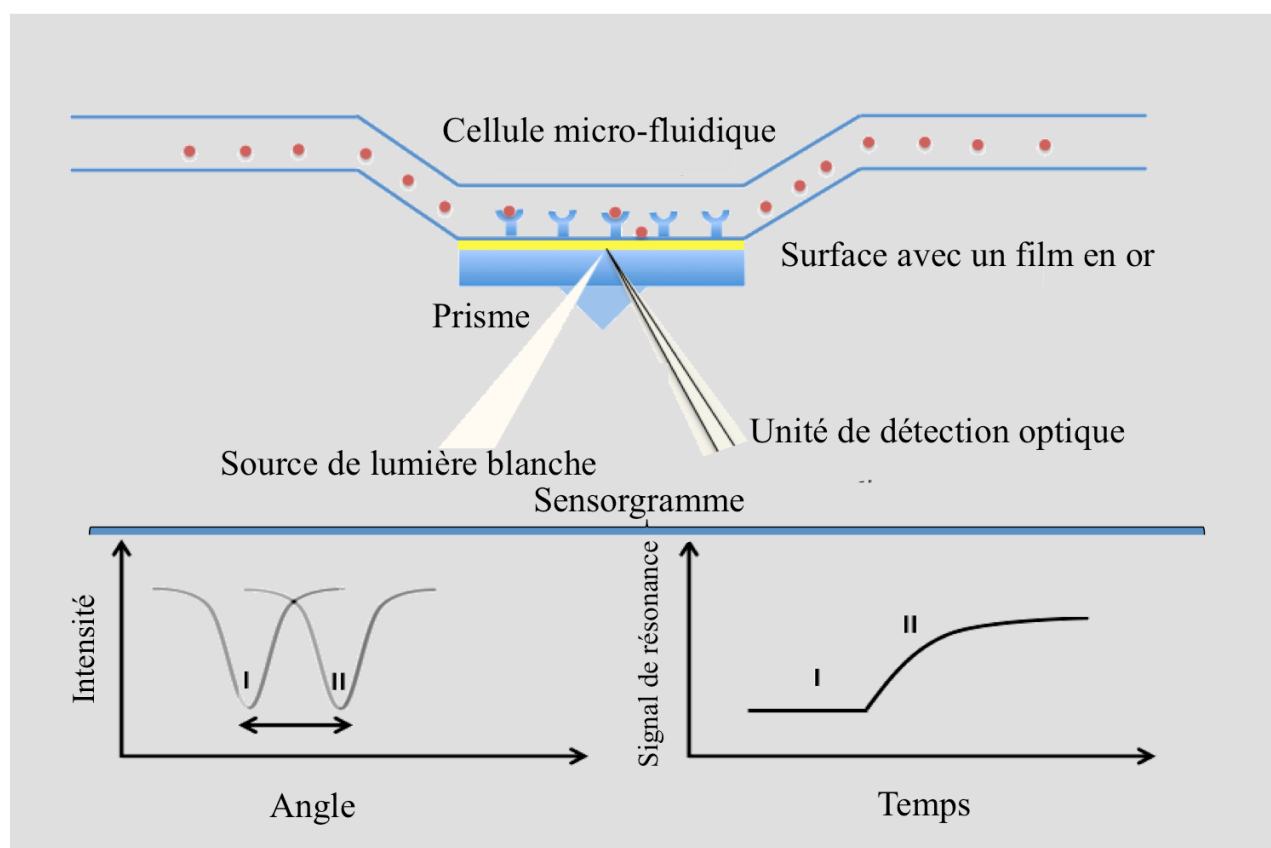


Figure 1.3 : Présentation schématique du principe de fonctionnement des biocapteurs SPR.

(Adapté (Mattei *et al.*, 2004).

Cette technologie a été commercialisée pour la première fois en 1990 par la société Pharmacia Biosensor sous le nom de BIACORE (Rich and Myszka 2006). Depuis, plusieurs plateformes ont été développées et commercialisées. La section qui suit donne un bref aperçu de ces technologies. Une attention particulière sera apportée à la technologie BIACORE car la majorité des publications (89%) utilisent ce genre de plateforme, maintenant commercialisées par GE Healthcare (Rich and Myszka 2008; Rich and Myszka 2010).

1.3.2 Différentes technologies commercialisées

Lors de l'année 2008, plus de 50 plateformes SPR, en production ou en développement ont été répertoriées (Chavane *et al.*, 2008; De Crescenzo *et al.*, 2008a; Rich and Myszka 2008). En 2007, plus de 1100 publications ont rapporté l'utilisation de 42 plateformes différentes, fabriquées par 25 manufacturiers. Les compagnies ainsi que les plateformes développées pour la SPR traditionnelle (nous n'aborderons pas l'imagerie SPR dans ce document) sont données dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Liste des principaux fabricants de biocapteurs SPR, des instruments et des sites web.

Manufacturier	Instrument(s)	Site web
BIACORE (GE Healthcare)	BIACORE Bialite, C, J, Q, X, X100, 1000, 2000, 3000, 4000 S51, T100, T200, A100, Biacore Flexchip.	www.biacore.com
Analytical μ -systems	Biosuplar, Biosuplar-2, Biosuplar-3, Biosuplar-6	www.micro-systems.de
Biosensing Instrument	BI-SPR 1000, BI 2000 System, BI 2000G, BI-3000 System, BI-3000G., EC-DualFlow TM , EC-SPR	www.biosensingusa.com
DKK-TOA	SPR-20	www.dkktoa.net
Microvacuum	OWLS	www.microvacuum.com
Moritex	SPR 670 M, SPR-CELLIA	www.moritex.co.jp
Bio-Rad	ProteOn XPR36	www.bio-rad.com
NTT-AT	Handy SPR	www.ntt-at.com
Optrel GBR	Multiskop	www.optrel.de
Reichert	SR7000DC	www.reichertspr.com
Resonant Probes	SPTM	www.resonant-probes.de
SensiQ Technologies	SensiQ	www.discoverensiq.com
Bionavis	SPR NAVI 200	www.bionavis.com

Les composantes principales d'un instrument SPR sont le prisme, la surface de capture collée au prisme et qui correspond au fin film métallique responsable du phénomène SPR (en or dans la plupart des cas), le détecteur (un tableau de diode) ainsi que les systèmes d'acheminement des échantillons (cellule micro-fluidique) et de contrôle de la température (puisque l'indice de réfraction dépend de cette dernière). Dans le cas des biocapteurs SPR, l'obtention de données fiables est dépendante de deux facteurs principaux : les propriétés de la surface du biocapteur (par exemple, sa capacité à limiter les interactions non-spécifiques) et le design de la cellule micro-fluidique qui contrôle l'acheminement des échantillons à la surface du biocapteur et donc la fiabilité des cinétiques enregistrées. Plus précisément, le système d'acheminement des échantillons doit assurer un contact rapide et uniforme entre les deux

partenaires biologiques : sa géométrie est importante car le cheminement de l'analyte au ligand immobilisé sur la surface détermine en grande partie la vitesse de criblage de l'instrument ainsi que la qualité de l'analyse qui pourra être effectuée par la suite (Baird and Myszkka 2001; Rich and Myszkka 2007). De nos jours, plusieurs géométries ont été mises au point par les différents constructeurs afin d'améliorer la capacité de criblage des instruments : certains permettent d'injecter simultanément plusieurs analytes sur un type de surface (donc sur un ligand), un analyte sur plusieurs surfaces (plusieurs ligands) ou encore plusieurs analytes sur plusieurs surfaces.

La technologie BIACORE a été révolutionnaire, du fait qu'elle a rassemblé en un seul instrument des systèmes micro-fluidique et optique performants, un type de surface permettant une chimie d'accroche variée et un niveau d'automatisation intéressant afin de faciliter l'étude des interactions entre molécules (Nice and Catimel 1999). La première série d'instrument BIACORE possédait quatre cellules micro-fluidiques (Hahnefeld *et al.*, 2004). Cependant l'échantillon n'était injecté que sur une cellule à la fois (Figure 1.4 A) sans possibilité de montage en parallèle ou en série. Donc, le même échantillon devait être injecté sur la surface où le ligand avait été immobilisé (la surface 'active'), puis sur la surface de référence (surface sans ligand immobilisé) en deux fois. Ce premier modèle était caractérisé par un temps d'expérimentation très long (Rich and Myszkka 2007).

Un changement au design de la cellule micro-fluidique a été apporté dans la version suivante (BIACORE 2000). Ce changement donne la possibilité de passer l'échantillon à travers quatre cellules en série, ou sur chaque cellule de façon indépendante (Figure 1.4 B). Ceci permet d'immobiliser trois ligands à la fois, donc de garder une surface de référence et de traiter trois interactions en même temps. Le résultat a été l'amélioration de la vitesse de criblage mais aussi

de la qualité des données grâce à la soustraction en ligne de la référence (Myszka 1999; Rich and Myszka 2001). La génération suivante d'instruments (BIAcore 3000) n'apporte pas de changement au design des cellules micro-fluidiques, mais une meilleure sensibilité de détection, permettant ainsi de suivre des interactions en présence de tampon à haut indice de réfraction. Les interactions impliquant de petites molécules de masse molaire avoisinant 200 Da peuvent être détectées avec cet instrument. Enfin la dernière génération d'instruments (BIAcore T100) raffine encore le degré d'automatisation et la vitesse de ce type de biocapteurs grâce à une nouvelle géométrie en U de la cellule micro-fluidique.

Le Modèle T100 est un nouvel outil BIAcore dont l'arrangement micro-fluidique est constitué de deux paires de cellules en forme de U (Figure 1.4. C et E). En jouant sur les points d'entrée et de sortie du liquide, l'un des bras du U peut être utilisé pour fixer le ligand et utiliser l'autre bras comme référence. Ce design minimise la distance entre les deux surfaces et améliore la correction du signal grâce à un contrôle négatif plus semblable (Papalia *et al.*, 2006; Rich and Myszka 2007). Ce design contraste avec celui retrouvé sur les BIAcore 2000 et 3000 qui utilisent des surfaces jointes par des systèmes plus complexes (Figure 1.4. B). L'utilisation de la cellule en forme de U améliore la qualité des données tout en gardant les fonctionnalités des anciennes cellules. De plus, l'implémentation d'un nouveau logiciel pour piloter ce type d'instrument facilite l'analyse des données générées grâce à une plus grande automatisation du traitement de données. Les BIAcore 2000, 3000 et T100 peuvent opérer à des températures variant entre 4 et 40°C ; ce sont les instruments les plus couramment utilisés dans les études rapportées dans les publications scientifiques (Baird and Myszka 2001; Rich and Myszka 2008).

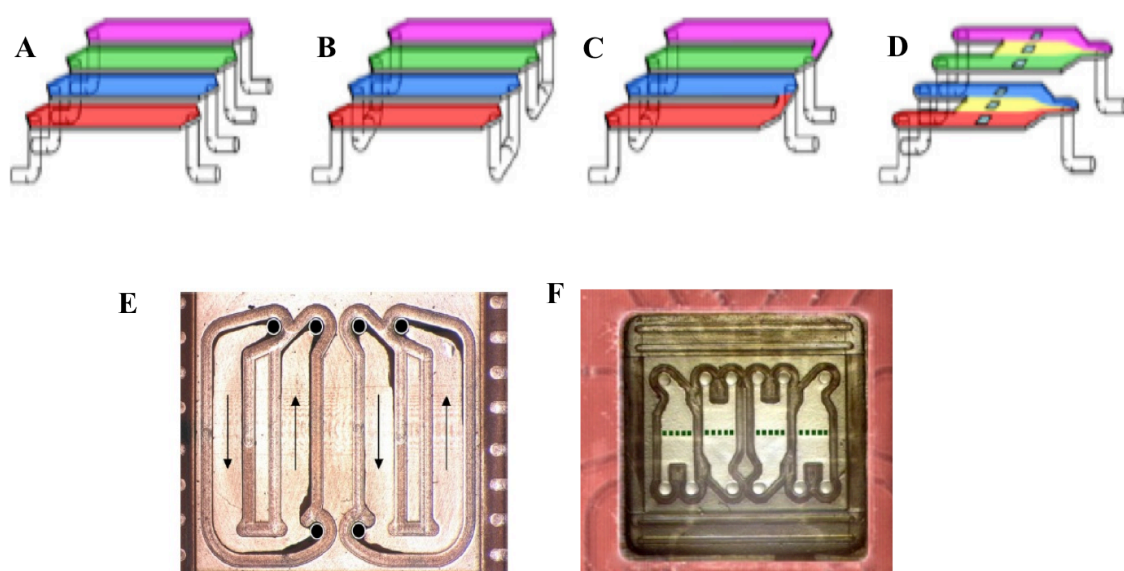


Figure 1.4 : Les différentes géométries et interconnexions entre cellules pour les différent biocapteurs commercialisés par BIACORE (adaptée de Rich et Myszka. (2007)) .
 Schématisation des cellules des BIACORE 1000 (A), 2000 (B), 3000 et T100 (C) et S51(D).
 Photographies de la cellule d'un BIACORE T100 (E) et d'un BIACORE A100 (F).

Le Modèle S51 est un outil, conçu spécialement pour le criblage de molécules de faibles poids moléculaires. Sur cet instrument, la cellule micro-fluidique a la forme d'un Y (Figure 1.4. D). Aucune paroi ne sépare les différentes zones correspondant aux différentes surfaces où les interactions seront suivies. Chacune de ces zones peut être atteinte de façon spécifique en variant les débits aux deux points d'entrée selon une procédure baptisée 'adressage hydrodynamique' par la compagnie. Le ligand est immobilisé sur le flanc extérieur du Y tandis que le centre reste libre et sert de référence. L'expérience consiste à injecter la solution d'analyte (le partenaire biologique en solution) sur toutes les surfaces simultanément. Cette simultanéité augmente la résolution de l'appareil car elle permet une soustraction du contrôle des données de manière fiable même pour les cinétiques très rapides, ce qui est souvent le cas pour les composés de faible poids moléculaire (Myszka 2004). Notons cependant que ce modèle de biocapteur est très peu utilisé dans la littérature. Enfin, le BIACORE A100 est une version du modèle S51 où quatre cellules micro-fluidiques à adressage hydrodynamique sont montées en parallèle, ce qui multiplie d'autant la capacité de criblage. Ce biocapteur a une capacité de criblage de 300 composés par jours, d'après BIACORE ; sa commercialisation traduit la demande des compagnies pharmaceutiques souhaitant intégrer le plus tôt possible une étape de criblage de qualité (c'est à dire permettant d'obtenir des données cinétiques fiables) dans le processus de criblage permettant l'identification de nouveaux composés thérapeutiques.

1.4 Mise en œuvre de la SPR pour la détermination des constantes cinétiques

Comme mentionné précédemment, la SPR permet de détecter un changement d'indice de réfraction proche d'une surface métallique. Puisque ce changement est proportionnel à

l'accumulation (ou la perte) de matière sur cette surface, le phénomène est exploité dans les biocapteurs afin de détecter les interactions entre un ligand immobilisé sur la surface et son partenaire biologique injecté au dessus de cette surface.

1.4.1 La surface du biocapteur

La surface où se déroule l'interaction à l'étude se doit d'être un élément remplaçable (jetable) du biocapteur. Elle se compose d'une lamelle de verre de même indice de réfraction que le prisme et elle sera collée à ce dernier lorsque insérée. Sur une des faces de la lamelle de verre, un fin revêtement d'or de quelques nanomètres d'épaisseur a été déposé. La surface du biocapteur a une importance capitale sur ses performances et la qualité des données recueillies : afin de limiter les interactions non-spécifiques entre la couche d'or (qui permet le phénomène SPR) et les biomolécules, la compagnie BIACORE a développé une technologie brevetée qui se résume à une matrice de polysaccharide greffée sur le métal via une couche de passivation (Figure 1.4). Cette matrice se compose plus spécifiquement de dextrane carboxyméthylé connu pour limiter l'adsorption non-spécifique des molécules biologiques (Monchaux and Vermette 2008; Monchaux and Vermette 2007). Les groupements carboxyl sur les chaînes saccharidiques permettront de greffer de façon covalente les ligands à la surface du biocapteur. Afin de contourner ce brevet, les compagnies concurrentes utilisent de l'alginate (un autre polysaccharide ; Bio-Rad) ou du polyéthylène Glycol (PEG ; Reichert) pour remplacer le dextrane carboxyméthylé. Lorsqu'introduite dans l'instrument, la surface verre/or/dextran est pressée à la fois contre le prisme du côté verre et contre les cellules micro-fluidiques décrites plus haut du côté dextrane (Figure 1.5) ; cette face devient ainsi une des surfaces des canaux dans lesquels les liquides vont être injectés pour procéder à l'immobilisation du ligand puis à l'études de ses interactions avec son (ses) partenaire(s) biologique(s).

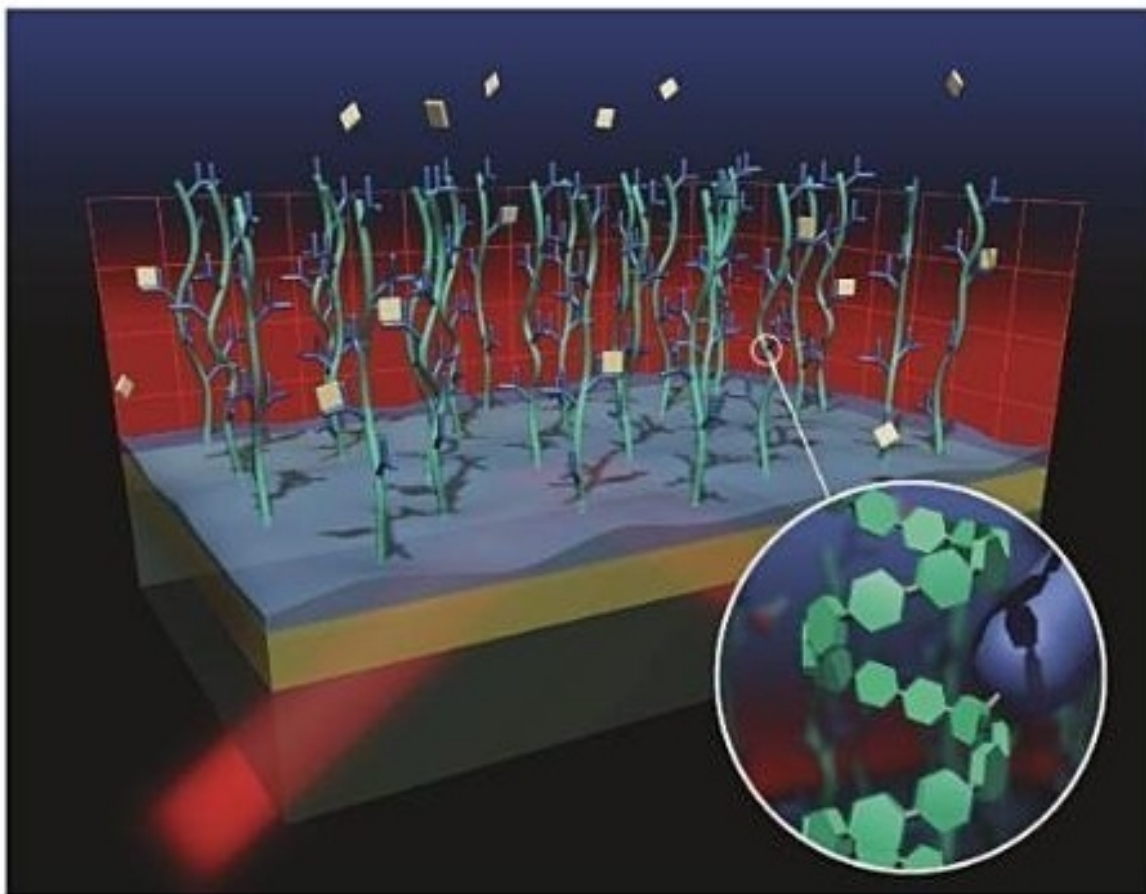


Figure 1.5 : La nanoarchitecture d'une surface SPR type (Schasfoort and Tudos 2008). Du bas vers le haut, les différentes couches colorées correspondent au verre, film d'or, à la couche de passivation. La matrice de dextrane carboxyméthylé est représentée par les traits verts sur lesquels les molécules de ligand (Y violets) ont été greffées. Les molécules d'analyte injectées (losanges) sont aussi représentées.

Pour une surface de dextrane présentant des groupements carboxyl, il existe différentes méthodes pour l'immobilisation covalente du ligand sur la surface. Toutefois, les biomolécules ainsi immobilisées peuvent voir leur bioactivité diminuer ou même disparaître. Cette perte peut alors être attribuable à diverses causes : le changement de conformation du ligand lorsqu'il est immobilisé, une orientation non-favorable, l'inactivation chimique du site de reconnaissance durant l'immobilisation (due au pH des tampons utilisés, par exemple) ou encore à cause de la gêne stérique résultant du greffage. Ces contraintes s'ajoutent à celles mentionnées précédemment, à savoir éviter les adsorptions non spécifiques du partenaire injecté. La méthode d'immobilisation doit être simple et rapide et permettre i) un contact direct des biomolécules avec la surface, favorisant le meilleur accès possible à l'analyte ; ii) l'immobilisation du plus grand nombre de ligand possible pour assurer une bonne sensibilité et longue stabilité (et le contrôle du niveau d'immobilisation) iii) de favoriser l'orientation des ligands immobilisés (les sites de liaison doivent être orientés vers la solution pour favoriser l'interaction avec l'analyte). De plus, la matrice d'immobilisation doit être biocompatible pour préserver l'activité de la biomolécule et prévenir les adsorptions non spécifiques. La méthode l'immobilisation la plus utilisée est l'immobilisation covalente. Selon Rich et Myszka (Rich and Myszka 2008), plus de la moitié des publications de 2007 l'utilisent en combinaison avec une surface de dextrane carboxyméthylé (CM).

1.4.2 Immobilisation covalente

La matrice hydrophile de dextrane CM offre une large surface, et une haute densité d'immobilisation de biomolécules. Les chaînes de CM sont attachées à la surface d'or via une mince couche alkyle nanométrique dont l'ancrage, très stable, est assuré par la coordination des atomes de soufre présent à la fin de la chaîne alkyle (De Crescenzo *et al.*, 2008a). Le CM est un

polymère très flexible, sa carboxymethylation crée une charge nette négative qui limite l'adsorption non spécifique. L'absence de réticulation entre les chaînes de CM crée un environnement tridimensionnel ouvert où la matrice de CM peut être utilisée pour la fixation covalente des protéines (De Crescenzo *et al.*, 2008a; Shankaran and Miura 2007; Stigter *et al.*, 2005).

1.4.3 Le couplage par les liaisons amines

Cette approche d'immobilisation de ligands est la plus utilisée parce qu'elle est directement applicable aux protéines (Rich and Myszka 2008; Rich and Myszka 2010), via les groupements amines présents sur leur queue N-terminale sur les chaînes latérales des résidus lysine (De Crescenzo *et al.*, 2008a). Avant l'immobilisation, les groupements carboxyles sont activés par une incubation avec de l'hydrochlorure de 1-éthyl-3carbodiimide (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS). La formation d'un réactif intermédiaire (N-hydroxysuccinimide ester) permet le couplage du ligand au groupement amine (Day *et al.*, 2002; Lortat-Jacob and Ricard-Blum 1997; Shankaran and Miura 2007; Stigter *et al.*, 2005) (Figure 1.6). Une injection d'éthanolamine est finalement réalisée pour bloquer les sites activés et qui n'ont pas réagi (Day *et al.*, 2002). Les avantages de la matrice CM sont nombreux. Selon Löfas et collègues (Löfas *et al.*, 1991):

- l'utilisation de la matrice de dextrane augmente la capacité d'immobilisation de protéines.
- l'immobilisation sur la CM améliore l'accessibilité.

- les groupements carboxyles présents sur la CM permettent une immobilisation chimique des protéines, donnant un ancrage stable des ligands. Ce genre de fixation permet la régénération de la surface.

Cependant la matrice de dextrane CM pose le problème d'adsorption non spécifique quand les injections correspondent à des solutions complexes, comme le plasma ou le sérum. Un autre problème est l'exclusion de protéine due à l'encombrement stérique et l'influence de la limitation par transfert de masse (Rich and Myszka 2008; Shankaran and Miura 2007). Rich et Myszka (Rich and Myszka 2008) rapportent que le couplage par liaison amine peut induire des problèmes d'orientation du ligand et donc d'hétérogénéité de surface et dans certains cas inactiver le ligand.

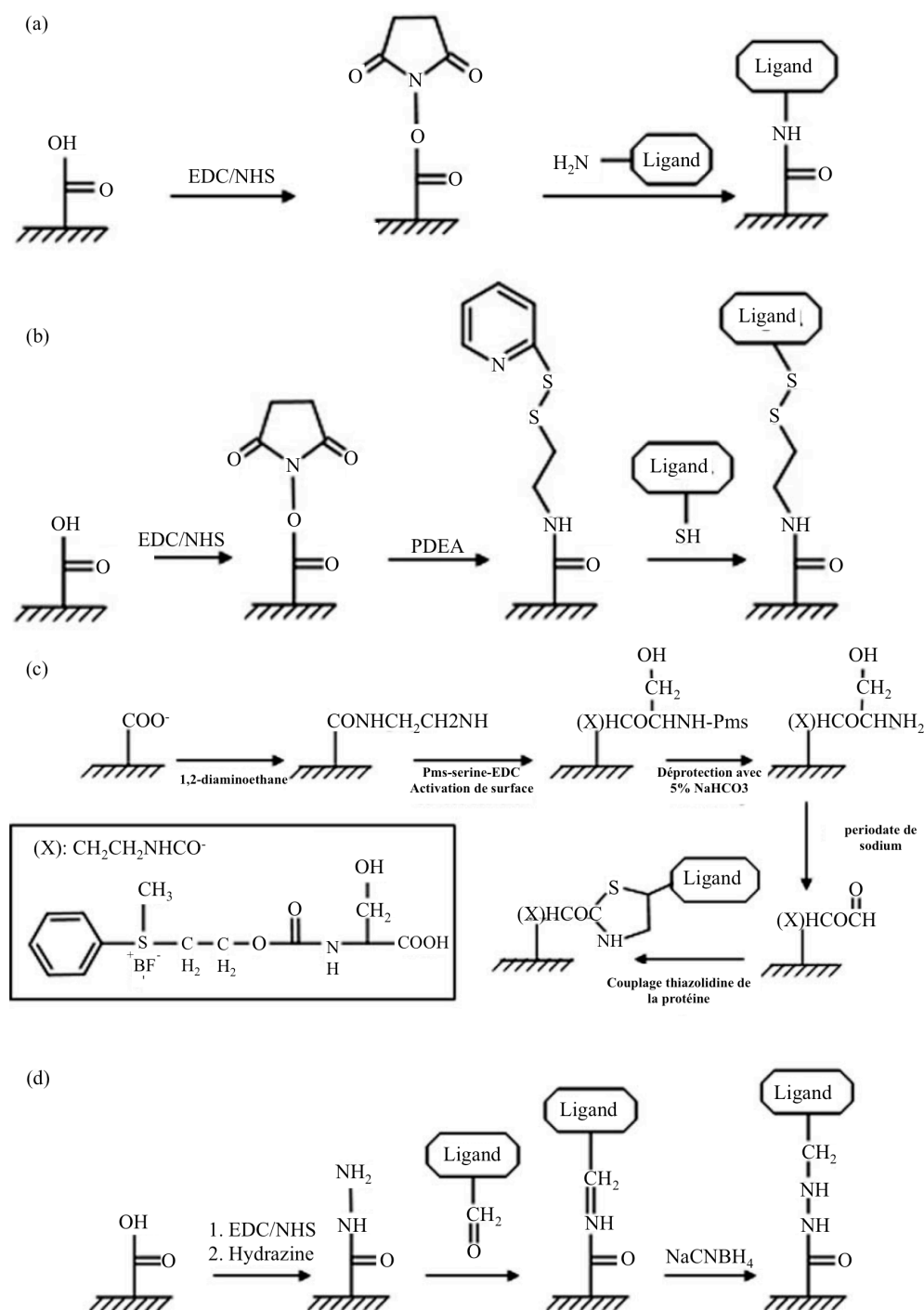


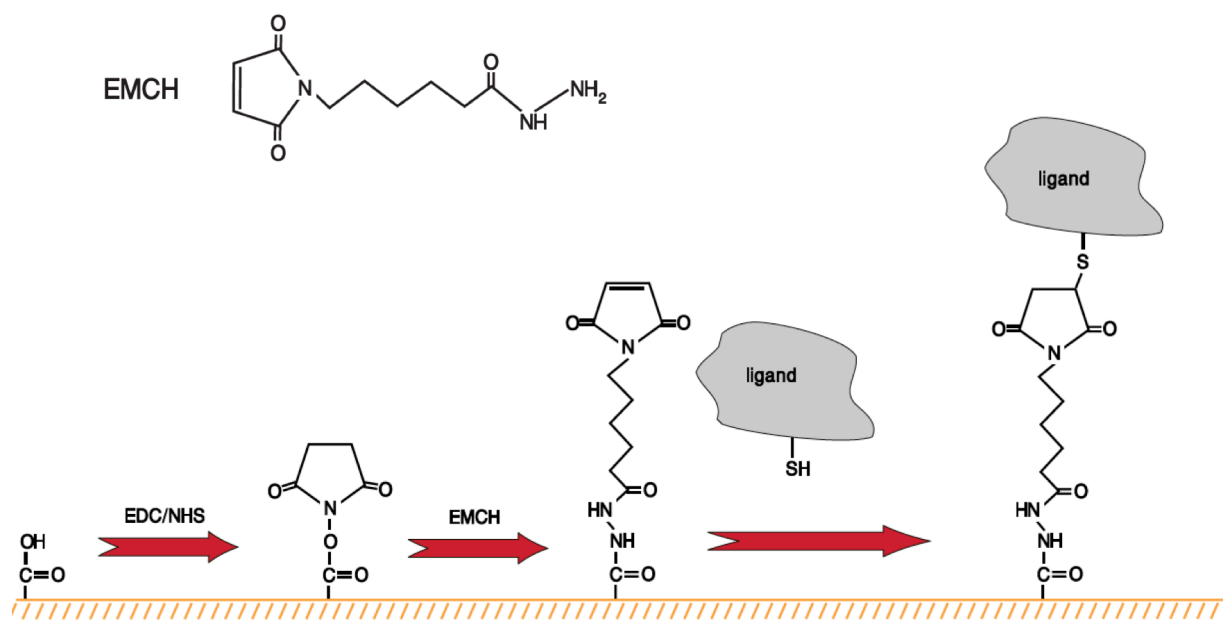
Figure 1.6 : Différentes technologie d'immobilisation (adaptée de (De Crescenzo *et al.*, 2008a).

a : couplage par liaison amine, b : procédure standard de couplage par liaison thiol, c : couplage par liaison thiol via Pms-Ser et d : couplage Covalente via une fonction aldéhyde.

1.4.4 Autres stratégies d'immobilisation covalente utilisant la fonction thiol

Une alternative au couplage amine est l'exploitation d'autres groupements fonctionnels présents sur les protéines ou ajoutés par ingénierie des protéines à cette fin (De Crescenzo *et al.*, 2008a). L'utilisation des groupements thiols est parfaitement adaptée pour les petits peptides, car un résidu cystéine peut être ajouté au peptide lors de sa synthèse (Chavane *et al.*, 2008; De Crescenzo *et al.*, 2003). La réaction de couplage la plus répandue (Figure 1.6 b) met en jeu un bras espaceur exposant un groupement partant soufré. Ce dernier réagit avec les groupements thiol présents sur le ligand. Ce type de couplage standard crée une liaison S-S instable, Wade et collègues (Wade *et al.*, 2006) ont mis au point une nouvelle approche sans liaison S-S (Figure 1.6 c). La voie des maléimides peut aussi être exploitée. Cette méthode consiste à injecter du N-[ϵ -maleimidocaproic acide]-hydrazide (EMCH) ou N[γ -maleimidobutyryloxy]sulfo-succinimide ester (Sulfo-GMBS), ces deux molécules contiennent la fonction maléimide, après l'injection de EDC/NHS (Figure 1.7). Il est alors possible d'immobiliser des ligands glycosylés en utilisant la partie sucre de ces glycoprotéines. Ces saccharides sont oxydés avec du periodate pour générer une fonction aldéhyde qui rend possible la fixation de la glycoprotéine, après transformation de la surface (Figure 1.6 d) (De Crescenzo *et al.*, 2008a).

a) Couplage via N-[-ε-maleimidocaproic acid]-hydrazide



b) Couplage via N-[-γ-maleimidobutyryloxy]sulfo-succinimide ester

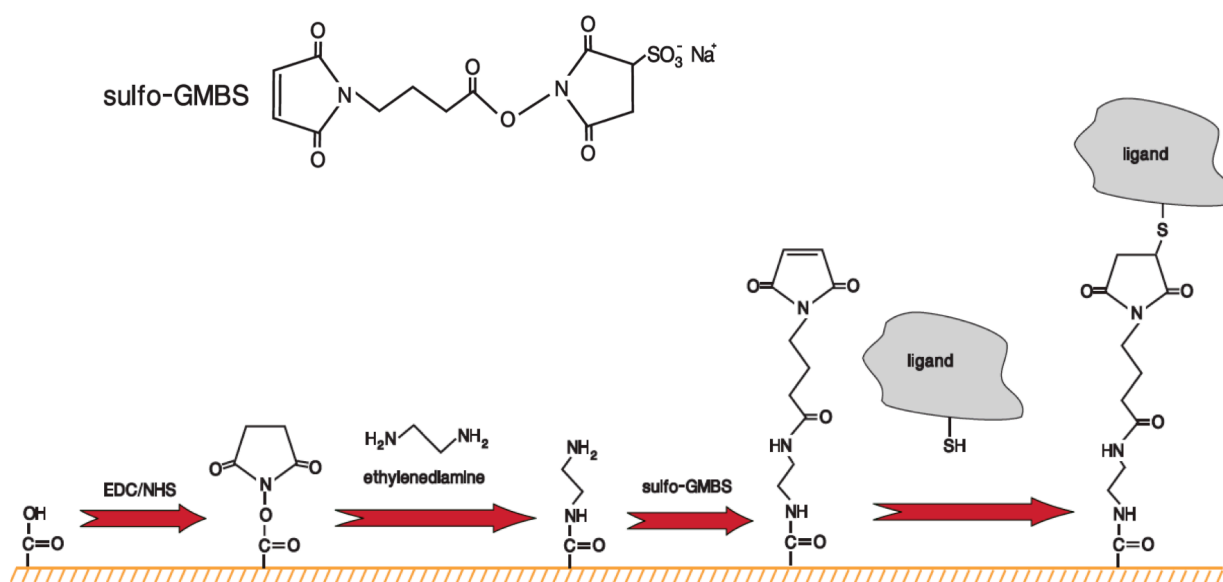


Figure 1.7 : Couplage thiol en utilisant la fonction maléimide (Biacore 2006b)

1.4.5 Surface de référence

Bien que la matrice de dextrane CM permet d'éviter une grande partie des interactions non-spécifiques, une surface de référence peut améliorer considérablement la qualité des données. L'utilisation de cette surface permet en effet de corriger certains *artefacts* : le changement d'indice de réfraction au début de chaque cycle (dû à un changement physique de solution et donc à une différence inévitable d'indice de réfraction), les effets de la matrice d'immobilisation, les interactions non spécifiques, le bruit et le saut de la ligne de base dus aux perturbations physiques (par exemple, le déplacement de l'aiguille du biocapteur ou encore le remplissage des seringues) et électriques (Myszka 1999) ainsi que la différence entre l'indice de réfraction entre le tampon circulant dans l'instrument et celui dans lequel l'échantillon est injecté. Il est préférable de traiter la surface de référence de façon similaire à la surface activée pour s'assurer que les mêmes conditions prévalent sur les deux surfaces (même traitement chimique que lors de l'immobilisation du ligand).

Les nouveaux instruments BIACORE permettent de suivre le signal sur quatre cellules en même temps. Ceci facilite l'utilisation de la surface de référence. Le signal sur cette dernière est suivi en temps réel en même temps que sur la surface où l'interaction a lieu (Figure 1.8. A). Le signal de référence est alors soustrait au signal de la surface activée. Cette première soustraction améliore drastiquement les données récoltées. Cependant, une légère déviation est souvent observée (Figure 1.8. B). Cette déviation est unique à chaque cellule micro-fluidique, surface et conditions opératoires. Ce léger décalage peut être corrigé en soustrayant la moyenne du signal obtenu en injectant du tampon (Figure 1.8. C), aux données récoltées après injection de l'analyte et soustraction de la référence, (Figure 1.8. D) (Rich and Myszka 2000). Cette technique de préparation de données est connue sous le nom de double-référencement (*double-referencing*).

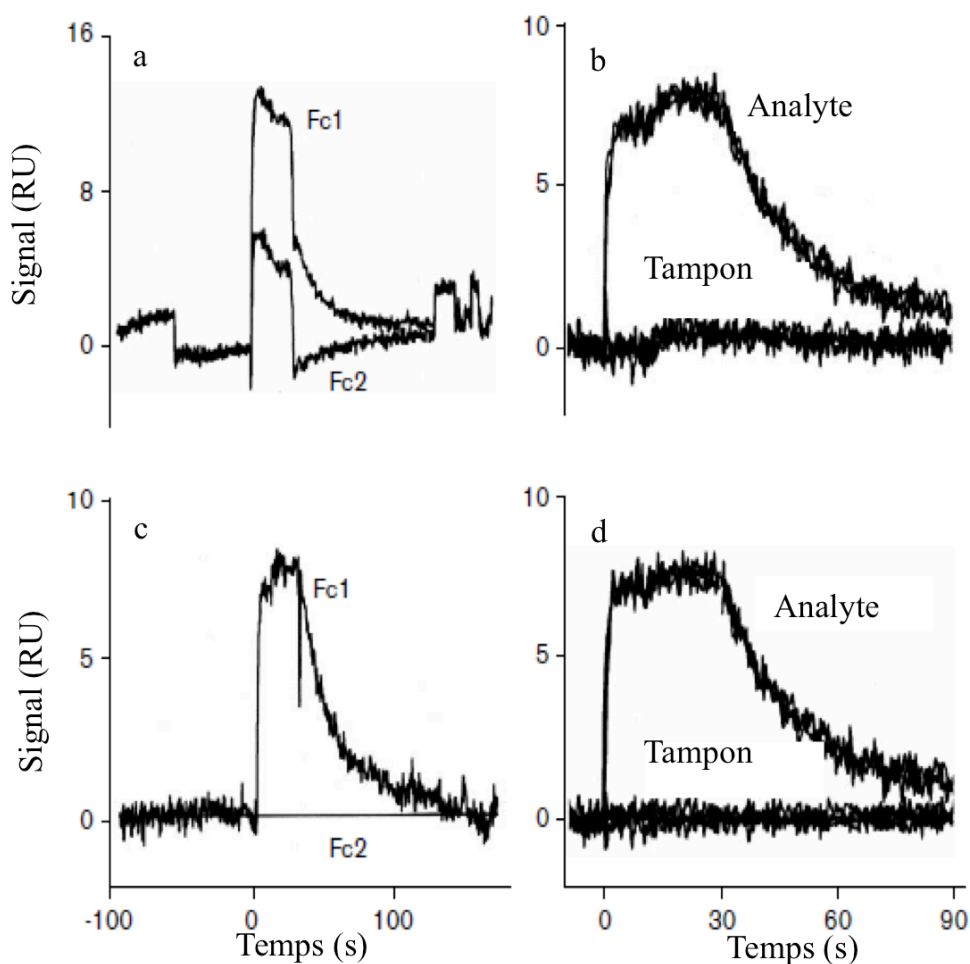


Figure 1.8 : Préparation des données SPR avant analyse - Méthode de double-référencage (Rich et Myszkowski.(2000)).

(a) Réponse de la surface activée et de la surface de référence. (b) Réponse après la soustraction de la référence. (c) La superposition de quatre injections d'analyte (1) et de tampon après soustraction de la référence (2). (d) Réponse correspondant à l'analyte et tapon après soustraction de (2). Fc1 et Fc2 représentent respectivement les données récoltées sur la surface active et la surface de référence

Aussi, il est préférable d'éliminer les quelques points correspondant au début de chaque injection et lavage lors de l'analyse des données, car il y a de forts changements d'indice de réfraction qui ne correspondent pas nécessairement à l'interaction entre les deux partenaires (Myszka 1999; Rich and Myszka 2000).

1.4.6 Le sensorgramme et l'approche expérimentale classique

Une fois le ligand fixé sur une surface et la surface contrôle préparée, l'analyse des interactions entre les deux partenaires biologiques peut commencer : l'ensemble des étapes menant à l'enregistrement d'une interaction est résumé dans la Figure 1.9. Les utilisateurs des instruments BIACORE procèdent, de manière classique, à des injections successives d'analyte à des concentrations différentes. Avant chaque série d'injections, un conditionnement de la surface est effectué en injectant une solution tampon (afin de stabiliser la ligne de base de l'instrument et augmenter la reproductibilité). Une fois la surface stabilisée, du tampon est injecté de façon continue sur la surface afin de fixer une valeur de base (Figure 1.9.b, phase 1). Puis, l'analyte est injecté à une concentration fixée (Figure 1.9.b, phase 2). Il migre alors de la solution vers la surface et interagit avec les molécules de ligand préalablement immobilisées. Lors de cette étape, une limitation par transfert de masse peut influencer les cinétiques biologiques des interactions rapides (Karlsson *et al.*, 1993). Pour éviter ou du moins minimiser ce problème, il est préférable d'effectuer les expériences à haut débit ($> 30 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$) et sur des surfaces où la densité de ligand est relativement faible (inférieure à 100 RU) (Myszka 1997). L'augmentation du débit de liquide augmente la diffusion vers la surface, et de la surface vers le flux d'analyte. L'augmentation du débit et la baisse de la densité évite la dilution des échantillons à la surface (Myszka 1997).

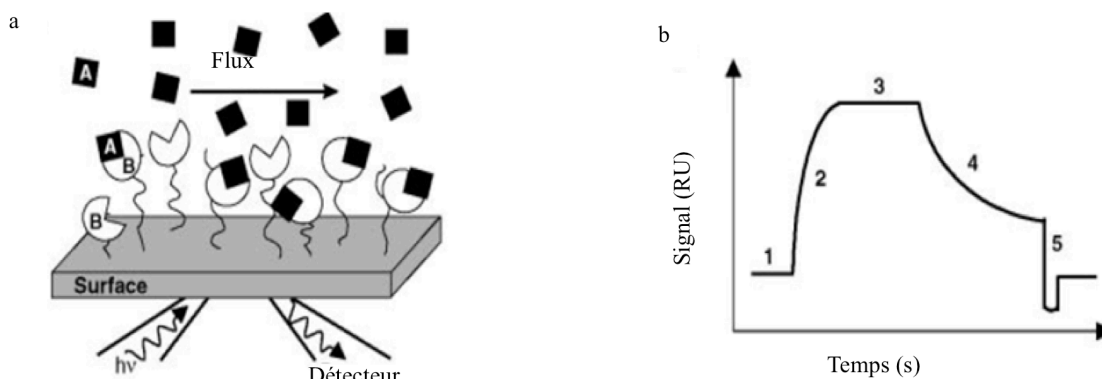


Figure 1.9: Schéma d'une expérience classique (Adapté de (Baird and Myszka 2001)). (a) Schéma d'une expérience classique. L'analyte A, en solution, est injecté en flux continu et interagit avec le ligand B préalablement immobilisé sur la surface. La formation du complexe AB est suivie en temps réel par un détecteur optique. (b) Réponse caractéristique enregistrée par le biocapteur. La ligne de base initiale correspond à l'injection du tampon sur la surface où est immobilisé le ligand (1), durant la phase d'association, l'analyte est exposé à la surface active. La réponse s'accroît avec la formation des complexes AB (2). La réponse atteint un plateau correspondant à l'équilibre entre association et dissociation (3). Durant la dissociation, les complexes formés sont dissociés en injectant du tampon, la stabilité du complexe formé préalablement peut être déterminée en observant cette phase (3). Si la dissociation n'est pas complète, une solution de régénération est injectée pour une dissociation complète (5).

Une fois l'injection de la protéine terminée, du tampon est alors injecté de façon continue afin de dissocier les complexes Analyte/Ligand précédemment formés (Figure 1.8.b, phase 3). L'analyte ainsi décroché est entraîné par le tampon. L'analyte doit être acheminé rapidement de la surface vers le flux une fois le complexe dissocié, pour éviter sa réassociation avec un autre ligand. Pour éviter ce phénomène, il est aussi préférable de procéder à haut débit et basse densité (Myszka 1997). Durant cette étape, le signal est suivi en temps réel pour collecter les données relatives à la phase de dissociation pour une meilleure identification des paramètres.

À la fin de chaque période de dissociation, si des complexes Analyte/Ligand sont encore présents à la surface du biocapteur, une régénération de la surface est nécessaire. Cette régénération peut s'effectuer grâce à une injection d'une solution dite de régénération (acide, base, sel, détergent ou combinaison de ces solutions) pour dissocier totalement l'analyte du ligand (Karlsson *et al.*, 2006) et donc de revenir à la ligne de base. L'ensemble de ces étapes constitue un cycle communément appelé sensorgramme dans le jargon SPR. La régénération doit permettre de s'assurer qu'à chaque cycle d'injection le même nombre de site de liaison soit disponible sur la surface pour la prochaine injection. La régénération est donc une étape critique qui se doit de préserver la bioactivité du ligand, car, si cette dernière était altérée, il serait impossible d'obtenir des constantes cinétiques valables à l'aide des logiciels d'analyse de données fournis par le fabricant de l'instrument (Karlsson *et al.*, 2006). Andersson et Hamalainen (Andersson and Hamalainen 1999) ont donné les lignes directrices à suivre pour trouver une solution de régénération satisfaisante à l'aide d'un plan expérimental. Il n'existe cependant pas de lois générales pour fixer les conditions optimales de régénération. L'altération de l'activité du ligand peut être observée en analysant deux sensogrammes dupliqués. Le signal

sur le deuxième duplicata serait moins élevé ce qui est dû à la perte d'activité de certains ligands et donc la diminution du nombre de sites disponibles.

Ce cycle d'injections (tampon / analyte / tampon / régénération) peut être répété en variant la température, la concentration de l'analyte, le temps d'injection et le temps de dissociation. En supposant que la régénération n'altère pas les propriétés de la surface activée (nombre de ligands et bioactivité), ceci conduit à l'enregistrement d'un ensemble de sensorgrammes qui décrivent l'interaction ligand-analyte. Afin d'extraire les constantes cinétiques, les données récoltées sont alors analysées de manière globale à l'aide d'un modèle mathématique qui suppose que les molécules de ligand sur la surface ne sont pas altérées par l'étape de régénération (le nombre de molécules saturant la surface et donc l'amplitude maximale du signal est donc un paramètre global). La régénération assure qu'à chaque début de cycle, l'analyte interagit avec le même nombre de site de liaison. Cette approche est pertinente quand la surface est facilement régénérable, ce qui est le cas dans plusieurs systèmes biologiques (les interactions étudiées dans les chapitres suivants en sont de bons exemples).

Afin de limiter la perte de temps liée à l'étape de régénération ou encore de s'exposer à une perte potentielle de bioactivité, un mode expérimental alternatif a été proposé : la titration en série. En effet, plusieurs publications sur les interactions entre protéines étudiées par SPR ont décrit des systèmes moléculaires pour lesquels les conditions de régénération n'étaient pas optimales. C'est le cas par exemple du TNF α (tumor necrosis factor α) qui est actif après sa fixation mais qui perd son activité après la régénération (Karlsson *et al.*, 2006).

La titration en série a été proposée pour résoudre ce genre de problème (Karlsson *et al.*, 2006; Rich *et al.*, 2008). Cette dernière consiste à faire des injections en série à des concentrations croissantes sans injection de tampon ni régénération entre les injections (Figure

1.10). Cette série d'injection est suivie d'une injection de tampon et si possible une étape finale de régénération (au lieu d'une après chaque injection d'analyte). Karlsson *et al.*, 2006 ont démontré que les valeurs des constantes cinétiques, calculées à partir de ce mode expérimental, sont similaires à celles obtenues par l'expérimentation classique.

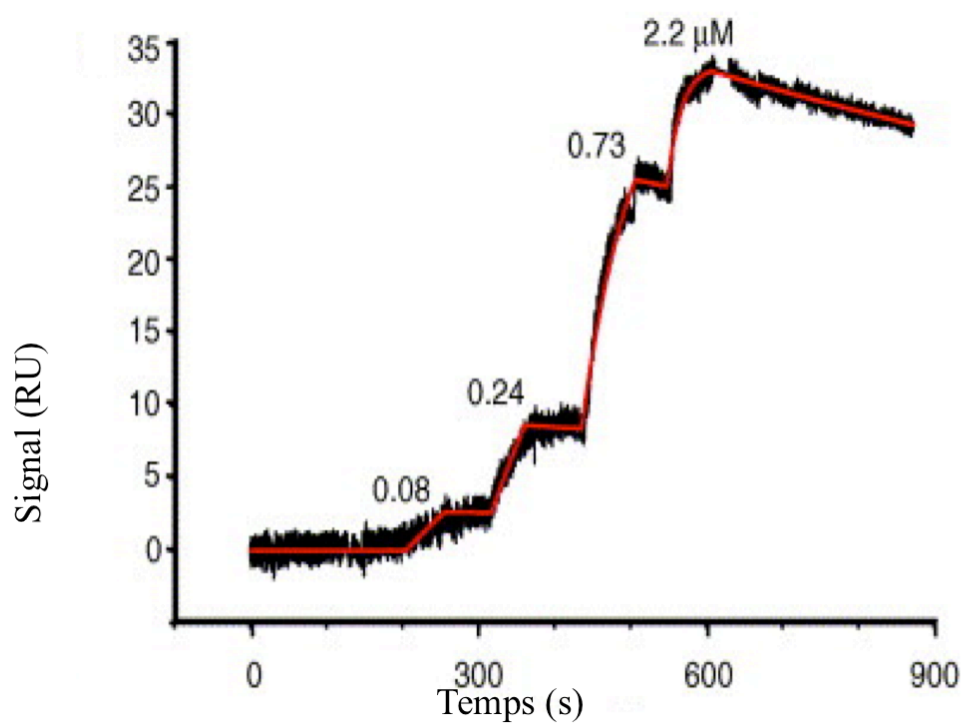


Figure 1.10 : Exemple de titration en série. (Adaptée de (Karlsson *et al.*, 2006)). Interaction entre molécule de faible poids moléculaire (analyte injecté à des concentration croissante : 0,08-2,2 μM) avec une protéine.

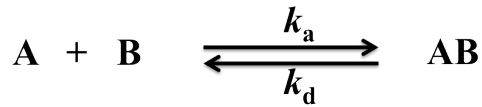
1.5 Modélisation des interactions

L'utilisation de la technologie BIACORE a été appliquée à l'étude des cinétiques d'interaction pour un grand nombre de systèmes biologiques : protéine-protéine, protéine-peptide, protéine-petites molécules, ADN-protéine etc ... et ce dès les premières années de l'introduction de cette technologie (Day *et al.*, 2002; Fisher and Fivash 1994; Szabo *et al.*, 1995). Rapidement, les données collectées pour plusieurs systèmes biologiques se sont avérées dévier d'un modèle cinétique simple de Langmuir. Ces déviations ont poussé la communauté scientifique à reconsidérer de façon critique les protocoles expérimentaux utilisés afin d'éliminer ou de minimiser les artefacts engendrant de telles déviations. Parmi ceux-ci citons l'hétérogénéité de surface provenant la plupart des cas d'une orientation aléatoire des molécules de ligand, les fortes densité de ligand à la surface du biocapteur qui peuvent mener à la sous-estimation des constantes cinétiques de dissociation des complexes « phénomène de '*rebinding*' » (Bowles *et al.*, 1997; Karlsson and Falt 1997; Schuck and Minton 1996). L'écart entre modèle simple et cinétiques biologique peut aussi dû aux particularités du système macromoléculaire (stoechiométrie différente de 1:1 (De Crescenzo *et al.*, 2001), changement de conformation cinétiquement limitant (De Crescenzo *et al.*, 2000)). Ainsi, lorsqu'après une optimisation consciencieuse des expériences, l'emploi d'un modèle cinétique simple ne permet pas d'obtenir une représentation des données satisfaisante, l'emploi de modèle cinétiques plus complexes peut s'avérer utile pour décrire les sensorgrammes recueillis. Il est à noter que, dans ce cas, une validation du modèle proposé par d'autres méthodes expérimentales (microcalorimétrie, ultracentrifugation analytique, test biologiques *in vitro*) est fortement conseillée (Schuck and Minton 1996). Dans le cas particulier des interactions entre protéines et petites molécules, le modèle simple de Langmuir décrit de façon adéquate les interactions dans la grande majorité des cas (Day *et al.*, 2002).

Lorsque les interactions entre protéines et petites molécules sont rapides, les cinétiques biologiques enregistrées peuvent être limitées par la diffusion de l'analyte en solution. Cette limitation peut être réduite en travaillant à haut débit et peut être prise en compte lors de l'analyse des sensorgrammes grâce à l'utilisation d'un modèle prenant en compte ce phénomène.

1.5.1 Modèle simple

Le modèle le plus simple (ou modèle de Langmuir) correspond à l'interaction directe entre une molécule de ligand et d'analyte et peut être schématisé comme suit:



Où k_a , k_d représentent respectivement la constante d'association et de dissociation en $M^{-1}s^{-1}$ et s^{-1} . A l'aide des instruments SPR, cette interaction est suivie en détectant l'accumulation de masse à la surface du biocapteur, qui résulte de la formation du complexe complexe AB. Cette accumulation est rapportée en unité de résonance (RU où $1RU = 10^{-10}g/mm^2$ pour des protéines) en fonction du temps. Les équations suivantes découlent de l'application des lois cinétiques:

$$\dot{R}_{AB} = k_a C_T (R_{max} - R_{AB}) - k_d R_{AB}, R_{AB}(0) = 0 \quad (1.1)$$

$$R = \begin{cases} R_{AB} + R_A, si C_T \neq 0 \\ R_{AB}, si C_T = 0 \end{cases}$$

Où C_T est la concentration de l'analyte A (en M) maintenue constante durant la phase d'injection ou nulle durant l'injection de tampon pour suivre la dissociation des complexes AB,

R_{max} le maximum d'analyte qui peut interagir avec le ligand pour une surface donnée (le signal à la saturation de la surface), R_{AB} (en RU) le signal enregistré correspondant au complexe AB formé, R_A (en RU) est un facteur correctif qui tient compte du changement d'indice de réfraction au début de chaque phase du sensorgramme. R (RU) est le signal à analyser pour l'identification des paramètres (De Crescenzo *et al.*, 2008b).

1.5.2 Modèle simple avec limitation par transfert de masse :

Pour qu'une interaction entre le ligand immobilisé et l'analyte injecté puisse avoir lieu, il faut que ce dernier soit transporté du liquide jusqu'à la surface où se trouve le ligand. Quand le transport de l'analyte vers, et de, la surface est plus rapide que les cinétiques de la réaction, le modèle simple décrit plus haut peut être utilisé pour la détermination des constantes cinétiques. Sinon, lorsque les cinétiques biologiques sont rapides (par exemple $k_a > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou $k_d > 10^{-1} \text{ s}^{-1}$), il faut tenir compte de l'effet de la limitation par transfert de masse (Goldstein *et al.*, 1999). Ce cas de Figure a été amplement étudié dans la littérature des biocapteurs SPR (Karlsson 1999; Myszkka 1997; Schuck 1996; Schuck and Minton 1996). Ce phénomène est relié à plusieurs paramètres propres au biocapteur (taille des canaux, débit, distribution du ligand dans le dextrane) et aux molécules à l'étude (coefficient de diffusion de l'analyte dans le dextrane et dans le liquide, constantes cinétiques).

La limitation de la diffusion de l'analyte vers la surface peut être modélisée par un système à deux compartiments relativement simple (Goldstein *et al.*, 1999; Myszkka 1997; Schuck and Minton 1996; Vijayendran and Leckband 2001). Avec la puissance croissante des ordinateurs l'approche simplifiée à deux compartiments commence à être remplacée par une simulation globale de l'équation générale de conservation, en utilisant la méthode des éléments finis (Gervais and Jensen 2006). Ce modèle est représenté par un ensemble d'équations différentielles

aux dérivés partielles (Goldstein *et al.*, 1999) présentant un nombre plus important de paramètres comparativement au modèle à deux compartiments. Il prend en compte le changement de concentration dans l'espace tridimensionnel et dans le temps (Gervais and Jensen 2006). Dû au nombre plus important de paramètre à estimer, le niveau de confiance peut être inférieur au modèle à deux compartiments. De plus, ce dernier est plus facilement et plus rapidement intégrable et son implémentation est plus facile, il donne des résultats pertinents (Khalifa *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 1999; Rich and Myszka 2008). Ce dernier considère deux zones d'écoulement, une fois le régime permanent établi et l'effet de l'entrée dans la cellule micro-fluidique disparu: une zone loin de la surface où la concentration est constante et égale à la concentration d'injection. Une zone où la concentration est fonction du temps (Goldstein *et al.*, 1999; Myszka *et al.*, 1997; Schuck and Minton 1996; Vijayendran and Leckband 2001).

$$\begin{cases} \dot{C}_A = -k_a C_A (\tilde{R}_{\max} - \tilde{R}) + k_d \tilde{R} + \tilde{k}_M (C_T - C_A) \\ \dot{R} = k_a C_A (R_{\max} - R) - k_d R \end{cases} \quad (1.2)$$

$$\tilde{R} = \frac{R}{h}, \quad \tilde{R}_{\max} = \frac{R_{\max}}{h}, \quad \tilde{k}_M = \frac{k_M}{h}$$

Où k_M correspond au coefficient de limitation par transfert de masse (cm/s) et C_A la concentration de l'analyte au voisinage de la surface où la réaction a lieu. h correspond à la hauteur de la cellule micro-fluidique. (Goldstein *et al.*, 1999) ont démontré que la valeur n'influence ni les constantes cinétiques ni les données expérimentales ; pour simplifier les calculs h est pris égal à 1 RU/M.

1.6 Identification des paramètres cinétiques

Nous avons abordé dans les sections précédentes les principaux facteurs à prendre en compte lors de la planification expérimentale, puis lors de la mise en œuvre de celle-ci, afin de collecter des données d'interactions pertinentes pour une analyse cinétique appropriée. Comme discuté, les conditions expérimentales et le système biologique dictent dans certains cas le choix d'un modèle cinétique particulier capable de prendre en compte certaines particularités de l'approche expérimentale (par exemple la limitation par transfert de masse) ou encore du système biologique à l'étude (par exemple la présence de deux sites d'interaction distincts sur le ligand). Les données ainsi recueillies sont alors analysées afin d'identifier les constantes cinétiques ; le modèle choisi doit aussi être validé. Si le modèle ne passe pas le test de validation, il faut revenir sur ses pas et réviser la procédure d'identification. Le modèle peut être déficient pour les raisons suivantes (Dochain and Vanrolleghem 2001; Ljung 1999) : i) la procédure numérique a échoué à trouver les meilleurs paramètres, ii) la fonction objectif n'est pas bien choisie, iii) le modèle n'est pas approprié pour la description du phénomène biologique étudié, iv) les données recueillies ne sont pas suffisantes pour identifier les paramètres. En effet pour ce dernier cas de Figure, l'expérimentateur a réalisé une série d'expériences en choisissant *a priori* des temps d'injection (t_a en secondes), de dissociation (t_d en secondes) et les concentrations d'analyte ; rien ne garanti que ce choix ait été éclairé.

Pour identifier les paramètres, deux approches sont utilisables selon le type d'erreur : le 'output error model' (OE) ou le 'prediction error model' (PE). Pour les deux modèles l'entrée est nécessaire (dans notre cas, la concentration d'analyte), ainsi que les données expérimentales. La différence entre les deux réside dans le calcul de la prédiction : le modèle OE utilise les valeurs passées des prédictions de la variable de sortie R , alors que PE utilise en plus des valeurs passées

des mesures de R. Si le modèle n'est pas adéquat, les deux méthodes peuvent induire un biais lors de l'identification de paramètres. Vu que le bruit des instruments utilisés dans notre laboratoire est blanc et gaussien (De Crescenzo *et al.*, 2008b) le modèle OE est plus approprié.

Pour identifier les paramètres du modèle le critère à utiliser est le maximum de vraisemblance ('maximum of likelihood') qui tend vers la différence des moindres carrées quand le bruit est blanc et gaussien, ce qui est le cas pour les données expérimentales provenant des instruments BIACORE. En effet, Ober et Ward (Ober and Ward 1999) ont démontré que la différence des moindres carrés satisfait au critère de Cramer Rao qui représente la borne inférieure sur la variance d'une estimation de paramètres sans biais. Ainsi l'algorithme de minimisation suivant et qui a été adopté pour l'identification des paramètres cinétiques dans tous les logiciels d'analyse des données BIACORE (De Crescenzo *et al.*, 2008b) est adéquat:

$$J(\theta) = \min_{\lambda} \sum_1^N \frac{1}{M^i} \sum_{j=0}^{M^i} (R_{exp}^i(j) - R_{pred}^i(j))^2 \quad (1.3)$$

où N est le nombre de sensorgrammes, M^i le nombre de points expérimentaux dans le sensorgramme i , R_{exp}^i est la mesure, R_{pred}^i est la prédiction du modèle présenté ((1.1) dans le cas du modèle simple et (1.2) dans le cas du modèle simple avec limitation par transfert de masse). λ est le vecteur paramètres du modèle utilisé.

L'intégration du modèle mathématique pour la détermination de R_{pred}^i peut se faire par différentes méthodes. Chaque type d'intégration donne son nom à la méthode d'identification des paramètres cinétiques.

1.6.1 Différentes méthodes de traitement des données expérimentales

Trois méthodes ont été chronologiquement utilisées: la linéarisation, l'ajustement de courbe avec intégration analytique et l'ajustement de courbe avec intégration numérique (Glaser 2000; Morton *et al.*, 1995).

1.6.1.1 Linéarisation

La linéarisation peut être utilisée quand le modèle simple est applicable. La valeur $k_a C_T + k_d$ est calculée en linéarisant les données récoltées durant la phase d'association à une concentration donnée.

$$\dot{R}_{AB} = k_a C_T (R_{max} - R_{AB}) - k_d R_{AB} \quad (1.4)$$

Si on porte sur un graphe \dot{R}_{AB} en fonction de R_{AB} , la droite aura une pente de valeur $-(k_a C_T + k_d)$. La valeur des pentes obtenues en faisant varier la concentration d'analyte A (C_T) d'un sensorgramme à l'autre peut être utilisée pour identifier k_a et k_d .

Durant la phase de dissociation, $C_T = 0$, de l'équation (1.4) on obtient alors:

$$\dot{R}_{AB} = -k_d R_{AB} \quad (1.5)$$

Si on représente \dot{R}_{AB} en fonction de R_{AB} , le résultat sera une droite dont la pente va correspondre à $-k_d$. Une autre approche, en assumant le profile exponentiel de la dissociation, serait de représenter $\ln(R_0/R_{AB})$, R_0 correspondant à la valeur du dernier point de la phase d'injection d'analyte, en fonction du temps, k_d peut être calculé grâce à la pente de la droite (Glaser 2000).

1.6.1.2 Ajustement de courbe et intégration analytique

La simplicité du modèle de Langmuir autorise une intégration analytique de l'équation (1.1) pour les phases d'association et de dissociation :

$$R_{AB} = k_{on} \frac{C_T R_{max} [1 - e^{-(C_T k_a + k_d) t}]}{(C_T k_a + k_d)} \quad \text{pour la phase d'association} \quad (1.6)$$

$$R_{AB} = R_0 e^{-(k_d t)} \quad \text{pour la phase de dissociation} \quad (1.7)$$

où R_0 correspond à la valeur de R_{AB} à la fin de la phase d'injection de l'analyte .

Les données expérimentales sont approchées par une méthode de minimisation, en choisissant un critère de minimisation (les moindres carrés par exemple) afin d'identifier les meilleurs paramètres.

1.6.1.3 Ajustement de courbes et intégration numérique

L'intégration numérique a l'avantage d'être applicable aux modèles plus complexes qui tiennent compte de la limitation par transfert de masse, ou de particularités biologiques. Ces modèles complexes se traduisent par plusieurs équations différentielles qui peuvent être résolues numériquement dans Matlab par les fonctions ODE (équations différentielles ordinaires). Une fois les équations intégrées, une méthode de minimisation est implémentée pour déterminer les constantes cinétiques.

Un logiciel spécialisé est fourni avec le BIACORE T100 pour la détermination des constantes cinétiques. Cependant, les méthodes d'intégration et de minimisation employées ne sont pas divulguées par la compagnie (Biacore 2006a).

1.6.2 Critique des méthodes

Les biocapteurs optiques permettent d'étudier l'interaction des macromolécules en temps réel. Cette particularité permet d'évaluer les constantes cinétiques d'interaction. Dans cette optique, les trois méthodes présentées ci-dessus ont été comparées (Morton *et al.*, 1995). Les méthodes de linéarisation et d'intégration analytique ont un champ d'application très réduit, elles ne s'appliquent qu'à des interactions décrites par un modèle simple (Morton *et al.*, 1995; O'Connor-McCourt *et al.*, 1998). Morton *et al.*, 1995 rapportent que dans la grande majorité des cas, la méthode de linéarisation est peu pratique car la linéarité est imparfaite. Cette méthode fait donc appel à un choix subjectif d'une portion de la courbe et, de plus, la quantité de données prises en compte s'en trouve réduite. Ce choix subjectif et cette perte d'information introduisent une erreur supplémentaire sur les paramètres identifiés. Le choix de la plage de linéarité pose aussi un problème pour l'automatisation de l'identification. De plus cette méthode est sensible au bruit car elle nécessite le calcul de la dérivée de R_{AB} . Par contre, cette méthode peut servir pour estimer les valeurs initiales nécessaires pour plusieurs méthodes numériques itératives.

L'intégration analytique est pertinente uniquement quand le modèle est simple (O'Connor-McCourt *et al.*, 1998); son application à des cinétiques complexes est inappropriée. Dans ce dernier cas, l'intégration numérique des équations différentielles reliées à des modèles cinétiques complexes est la seule approche disponible pour traiter le problème (O'Connor-McCourt *et al.*, 1998). Il est toutefois important de souligner que la méthode analytique est préférable quand le modèle est simple, car l'intégration numérique de l'équation différentielle à chaque itération peut prendre plus de temps.

Enfin, il est aussi important de souligner qu'un traitement global des données, à savoir une identification des paramètres cinétiques en utilisant simultanément tous les sensorgrammes

généralisés est très important car i) il augmente la confiance quant à l'adéquation du modèle cinétique choisi (quoique cette confiance soit subjective car elle est basée sur l'inspection visuelle des résidus - différence entre points calculés et expérimentaux); ii) il augmente la confiance sur la valeur des paramètres cinétiques (Khalifa *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 1995; O'Connor-McCourt *et al.*, 1998).

Dans le cas d'une approche par ajustement de courbe combinée à l'intégration numérique, la recherche des paramètres se fait par une approche itérative en utilisant des fonctions de minimisation. Plusieurs approches de minimisation peuvent résoudre ce genre de problèmes.

1.7 Méthodes de minimisation

La recherche des meilleurs paramètres d'un modèle s'effectue toujours par la minimisation de l'écart entre la prédiction du modèle et les données expérimentales. Cet écart représente la fonction objectif du problème d'optimisation à résoudre. Les méthodes numériques d'optimisation peuvent chercher les paramètres d'une manière systématique en minimisant la fonction objectif. Cependant, un minimum peut être local (dans voisinage restreint de l'espace de l'espace faisable) ou global (dans tout l'espace faisable - Figure 1.11). Il faut donc porter une attention particulière au choix des algorithmes de minimisation afin d'éviter de converger vers un minimum local différent du minimum global. Ces algorithmes nécessitent une estimation initiale pour commencer le processus itératif. Cette dernière a une grande importance puisqu'elle peut donner une direction permettant de converger directement et rapidement vers le minimum global. L'analyse de la Figure 1.11, montre que si l'estimation initiale se trouve à la gauche du minimum local, il est possible de rencontrer un minimum local, mais si elle est à droite du minimum global, ce minimum local sera vraisemblablement évité.

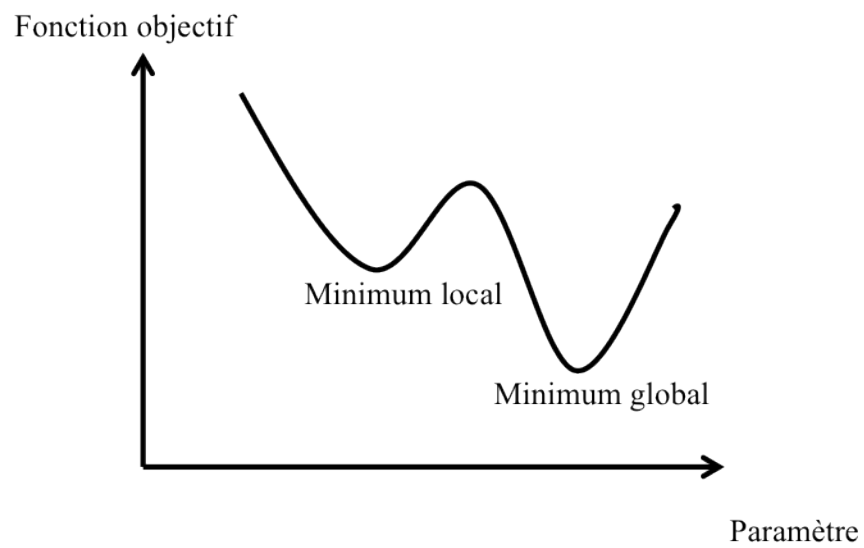


Figure 1.11 : Maximum local et global d'une fonction objectif. (Adapté (Dochain and Vanrolleghem 2001)).

Le fonctionnement de ces algorithmes est schématisé à la Figure 1.12. Une estimation initiale est fournie à partir d'elle une première prédiction du modèle est calculée. Puis la valeur de la fonction $J(\theta)$ (eq. 1.3) est calculée en confrontant les données à la prédiction. Une autre estimation des paramètres est effectuée et envoyée au modèle pour une nouvelle prédiction. Si le critère de convergence est satisfait, l'algorithme renvoie les valeurs des paramètres à l'utilisateur comme étant la meilleure estimation, sinon, il continue le processus itératif. Le nombre maximum d'itération est un critère d'arrêt. Les itérations sont arrêtées s'il n'y a pas d'amélioration dans la fonction objectif avec les dernières itérations.

Il faut noter que le temps de calcul est en grande partie dû à l'intégration des équations du modèle. N'importe quelle approche permettant de minimiser le temps d'intégration est à prendre en considération. Une solution est de choisir l'algorithme de minimisation qui nécessite le moins d'itérations possibles considérant le modèle d'intégration utilisé pour trouver les paramètres.

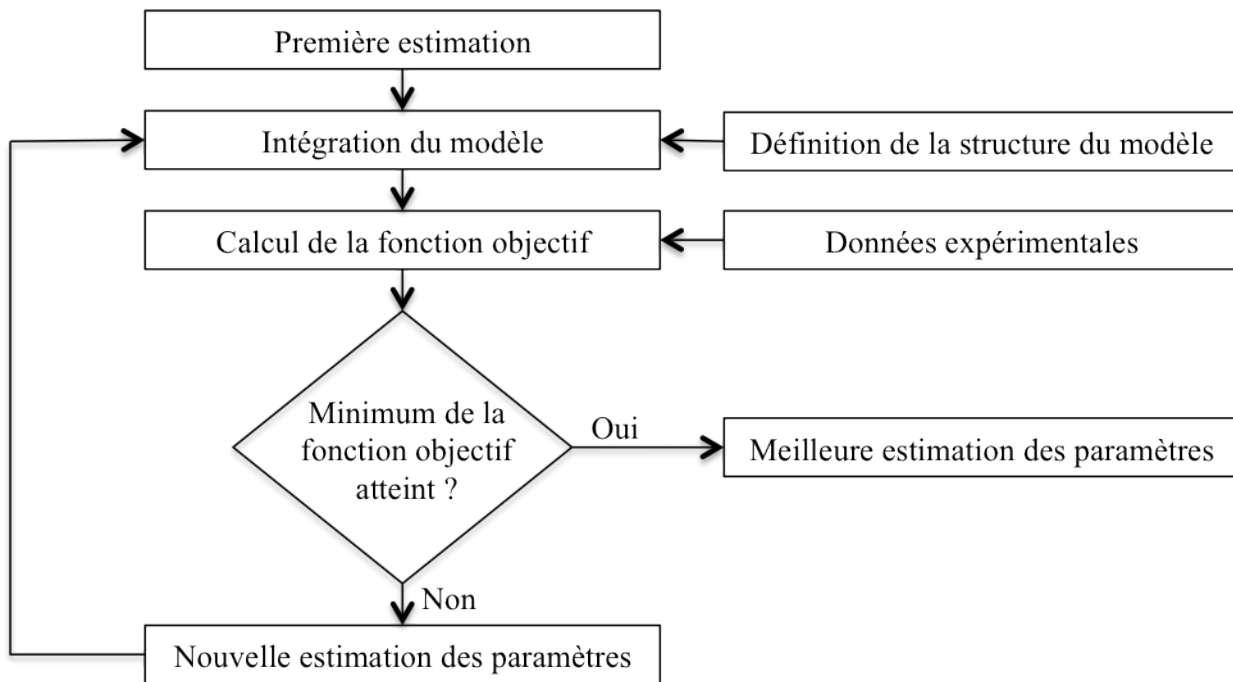


Figure 1.12 : Illustration de la routine d'estimation des paramètres (Adapté (Dochain and Vanrolleghem 2001)).

1.7.1 Méthode de minimisation locale

1.7.1.1 Méthode utilisant le gradient

Un grand nombre d'algorithmes a été développé pour trouver un minimum local et plusieurs d'entre eux utilisent l'information donnée par le gradient de la fonction objectif. Cette information est supposée connue ou calculée par des approximations numériques (Dochain and Vanrolleghem 2001). Ces méthodes nécessitent moins d'itérations que les méthodes d'optimisation directe (Pearson *et al.*, 2006). L'utilisation de ces algorithmes exige l'existence et la continuité de la fonction objectif ainsi que de ses dérivées première et seconde (Pearson *et al.*, 2006). Les éléments du gradient de la fonction objectif sont supposés connus ou approchables par une approximation numérique. Les méthodes de minimisation numériques emploient souvent la procédure itérative suivante :

$$x^{(k+1)} = x^{(k)} + \alpha^{(k)} s(x^{(k)}) \quad (1.8)$$

Où x^k représente la $k^{ième}$ estimation de la solution x^* , $\alpha^{(k)}$ la longueur du pas d'optimisation et $s(x^{(k)}) = s^{(k)}$ représente la direction de recherche. Les différents algorithmes d'optimisation se distinguent les uns des autres selon la méthode utilisée pour déterminer $s^{(k)}$ et $\alpha^{(k)}$ à chaque itération. Généralement, $\alpha^{(k)}$ est choisi pour minimiser la fonction objectif dans la direction $s^{(k)}$.

1.7.1.1.1 L'algorithme de Levenberg-Marquardt

Cet algorithme combine l'algorithme de Cauchy et celui Newton. L'algorithme de Cauchy est basé sur le choix optimal de $\alpha^{(k)}$ qui donne la descente vers l'optimum. En analysant le développement de Taylor au premier ordre (jusqu'à la première dérivée) de la fonction objectif

au point \bar{x} , la direction est choisie $s(\bar{x}) = -\nabla f(\bar{x})$ et α est fixé comme un paramètre positif. Cette méthode a deux inconvénients, le choix arbitraire de α ainsi que la lenteur inhérente près de l'optimum. Cette lenteur est due au choix de s car ∇f tend vers 0 au voisinage de l'optimum. Cauchy a proposé de choisir un pas d'optimisation $\alpha^{(k)}$ de telle sorte que $f(x^{k+1})$ soit minimum le long de $\nabla f(x^{(k)})$. Mais la convergence de cette méthode reste lente parce que le changement dans les variables est directement lié au gradient qui tend vers zéro au voisinage de l'optimum.

L'algorithme de Newton considère quant à lui l'information portée par la dérivée seconde pour remédier aux insuffisances de l'estimation de Cauchy mais la direction opposée au gradient n'est pas toujours une direction de descente efficace selon la nature de la fonction objectif (Pearson *et al.*, 2006). D'autant plus que cet algorithme nécessite les valeurs $f(x^{k+1})$ et du gradient à chaque itération, ce qui rend l'algorithme plus lent. L'algorithme de Newton utilise la progression suivante :

$$x^{(k+1)} = x^{(k)} - \nabla^2 f(x^k)^{-1} \nabla f(x^k) \quad (1.9)$$

Cette méthode converge rapidement. Cependant, elle n'utilise pas un pas d'optimisation pour la minimisation, ce qui peut poser des problèmes de divergence quand la fonction n'est pas quadratique. Une solution simple et logique à ce problème est d'assurer une descente vers le minimum en ajoutant une estimation de Cauchy.

$$x^{(k+1)} = x^{(k)} - \alpha^k \nabla^2 f(x^k)^{-1} \nabla f(x^k) \quad (1.10)$$

Cette méthode est connue sous le nom de la méthode modifiée de Newton. La difficulté d'application de cette méthode réside dans le calcul du Hessien $\nabla^2 f(\bar{x})$ à chaque itération. La méthode de Marquardt combine convenablement la méthode de Cauchy et celle de Newton en

utilisant les forces de chacune, mais nécessite la connaissance de l'information portée par la dérivée seconde. Choisir le gradient comme direction de minimisation permet d'approcher rapidement le minimum quand la valeur initiale est loin de ce dernier. D'autre part la méthode de Newton donne une excellente direction au voisinage du minimum. C'est cette constatation qui a poussé Marquardt à définir la direction s comme suit :

$$s(x^{(k)}) = - [H^{(k)} + \Psi^{(k)}I]^{-1} \nabla f(x^{(k)}) \quad (1.11)$$

Où I est la matrice identité et H représente le Hessien. Dans cette méthode, $\alpha = 1$ puisque Ψ est utilisé à la fois pour contrôler la direction de descente et la longueur du pas d'optimisation. $\Psi^{(0)}$ est choisi suffisamment grand pour que $s(x^{(0)}) \rightarrow -\nabla f(x^{(k)})$. Quand Ψ décroît vers zéro, $s(x)$ passe du gradient à la direction Newtonienne. L'avantage de cette méthode est sa simplicité, la présence de la descente, l'excellence de la convergence près du minimum et l'absence de l'estimation de Cauchy ; son principal inconvénient réside dans l'utilisation du Hessien. La méthode de Levenberg-Marquardt et BFGS (Broyden, Fletcher, Goldfarb et Shanno) utilisent le principe de l'algorithme de Newton modifié et sont connues sous le nom : méthodes quasi-newtoniennes (Dochain and Vanrolleghem 2001; Pearson *et al.*, 2006).

1.7.1.2 Méthode de minimisation directe

Ces méthodes ont besoin de moins de préparation pour l'implémentation car elles ne nécessitent pas un calcul préalable de la dérivée. La minimisation simplex appartient à ce groupe d'algorithmes puisqu'elle n'utilise que la valeur de la fonction elle-même pour trouver son optimum. Cette méthode est connue pour sa robustesse.

La méthode simplex est basée sur l'utilisation du concept géométrique du simplex. Ce dernier est une généralisation d'un triangle ou d'un tétraèdre. Un simplex à n dimension est un

polytope qui représente l'enveloppe convexe de ses $n+1$ sommets, pour triangle $n = 2$ et pour tétraèdre avec $n = 3$.

En commençant par un simplex initial, des étapes élémentaires sont développées pour évaluer la fonction objectif aux sommets du simplex et en remplaçant le sommet ayant la plus grande valeur de fonction objectif par un autre point de l'espace. Ceci assure que tout nouveau point sera plus proche de l'optimum que le point remplacé.

La Figure 1.13 présente la progression de l'algorithme en utilisant un exemple à deux dimensions. Les vertices 1, 2 et 3 forment le simplex initial et la progression de la formation des simplexes avec les itérations est représentée. Cette méthode est très appréciée pour sa robustesse pour trouver le minimum local.

1.7.2 Minimisation globale

Les méthodes de minimisation locale peuvent converger vers des minimas locaux, ce qui les désavantage par rapport aux méthodes d'optimisation globales. Ces dernières sont séparées en deux groupes : les méthodes déterministes et les méthodes stochastiques. Les méthodes stochastiques utilisent des approches aléatoires pour chercher l'optimum. L'algorithme génétique fait partie de ces méthodes. Cet algorithme commence avec une population d'estimés initiaux sélectionnés aléatoirement dans l'espace des paramètres et effectue un grand nombre d'estimations pour générer une nouvelle population d'estimés. Les valeurs de la fonction objectif à chacun des « individus de cette population » influencent la sélection des prochains candidats. Cet algorithme nécessite un grand nombre d'estimations, ce qui le rend lent. De plus il a été rapporté qu'il converge souvent vers le voisinage de l'optimum non pas vers l'optimum. (Dochain and Vanrolleghem 2001)

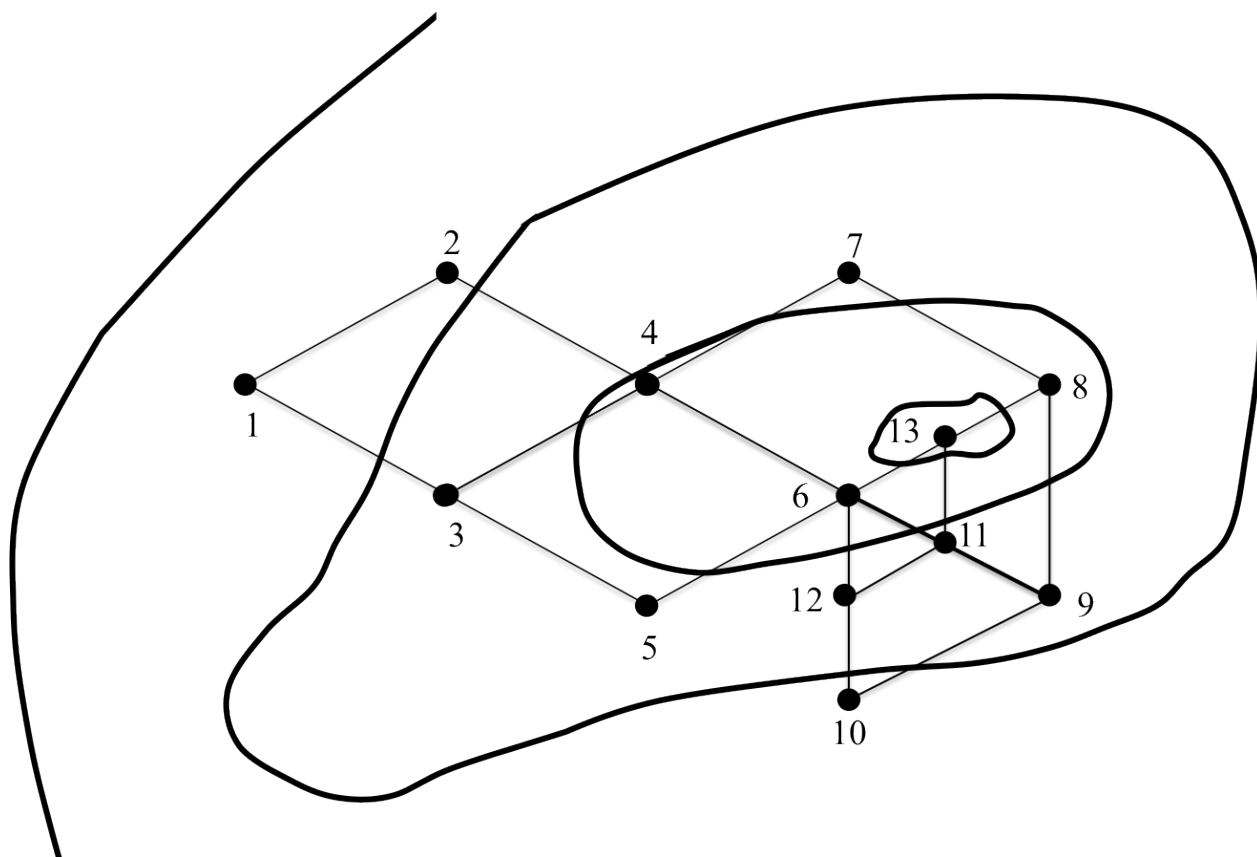


Figure 1.13 : L'algorithme simplex pour un problème d'optimisation à deux dimensions.

(Adapté (Dochain and Vanrolleghem 2001))

1.7.3 Optimisation sous contraintes non-linéaires

Les problèmes d'optimisation sans contraintes peuvent être résolus par les méthodes précédentes. Cependant la majorité des problèmes d'optimisation en ingénierie impliquent des problèmes d'optimisation sous contraintes. La présence de ces dernières dans le problème d'optimisation réduit l'espace dans lequel l'optimum est recherché. A priori, ceci facilite la recherche de l'optimum puisque l'espace est réduit. Cependant, la présence des contraintes complique le problème d'optimisation puisqu'il faut en tenir compte et les intégrer dans la formulation du problème d'optimisation et sa résolution par la suite. Les algorithmes développés pour l'optimisation sans contraintes s'en trouvent non applicable.

Les problèmes d'optimisation sous contraintes sont définis comme suit :

$$\begin{cases} \min & f(x); x \in R^N \\ & g_i(x) \geq 0, j = 1,2,3, \dots, J \\ & h_k(x) = 0, k = 1,2,3, \dots, K \\ & x_i^{(l)} \leq x_i \leq x_i^{(u)} i = 1,2,3, \dots, N \end{cases} \quad (1.12)$$

Où f représente la fonction objectif, g_i représente l'ensemble des contraintes non linéaires d'inégalité, h_k représente les contraintes non linéaires d'égalité et $x_i^{(l)}$ et $x_i^{(u)}$ les bornes inférieures et supérieures. En assumant que $x^{(0)}$ est le point initial qui doit satisfaire les contraintes, $x^{(t)}$ représente le point générique, $x^{(T)}$ la meilleure estimation de l'optimum x^* , $x^{(t)}$, $t=1,2,3,\dots, T$, représentent les points de la régression vers l'optimum. Les méthodes les plus utilisées pour la résolution de ce type de problèmes sont les méthodes utilisant les multiplicateurs de Lagrange, les méthodes de linéarisation itérative, les méthodes utilisant la programmation quadratique itérative et les méthodes utilisant les fonctions de pénalité

Le problème d'optimisation sous contraintes peut être transformé en un problème d'optimisation sans contrainte grâce à une fonction pénalité. La formulation de la fonction pénalité discrimine les différentes méthodes de résolution des problèmes d'optimisation sous contraintes utilisant le concept de pénalité. Ces méthodes sont connues, dépendamment de la séquence des points estimés x^t , sous les noms des méthodes des points intérieurs ou méthodes des points extérieurs. Quand la séquence des estimés x^t contient les deux catégories de points, on dit que la méthode est mixte (Reklaitis *et al.*, 1983).

Soit la fonction : $P(x, R) = f(x) + \Omega(R, g(x), h(x))$

Où R est le vecteur de paramètres de pénalité et Ω , le terme de pénalité, est une fonction de R et des fonctions contraintes. Une méthode de points intérieurs résulte de la sélection d'une fonction Ω qui force les points de la régression $x^{(t)}$, $t=1,2,3,\dots T$ de $P(x, R)$ à être dans la région faisable. Ce type de méthode est appelé « méthode barrière », où tous les points de la régression ne sortent pas de la région déterminée. Toute méthode de transformation doit satisfaire les critères suivants :

1. La solution doit approcher l'optimum du problème d'optimisation sous contrainte :

$$\lim_{t \rightarrow T \leq \infty} x^{(t)} = x^*.$$

2. La minimisation de $P(x, R)$ doit être similaire en difficulté à la minimisation de la fonction $f(x)$.
3. $R^{(t+1)} = F(R^{(t)})$ doit être simple. Ce calcul doit être beaucoup plus simple par rapport à la recherche de l'optimum en soit.

Il existe plusieurs formes de la fonction Ω : parabolique, inverse et logarithmique. Selon (Wright and Orban 2002) les problèmes d'optimisation utilisant la pénalité logarithmique sont définis comme suit :

$$\begin{cases} \min & f(x); x \in R^N \\ & g_i(x) \geq 0, j = 1, 2, 3, \dots, J \\ & x_i^{(l)} \leq x_i \leq x_i^{(u)} i = 1, 2, 3, \dots, N \end{cases} \quad (1.13)$$

$$P(x, R) = f(x) + \Omega(R, g(x)) = f(x) - R \ln (g(x)) \quad (1.14)$$

La pénalité est positive pour tout les x tel que $0 < g(x) < 1$ et négative pour tout x tel que $g(x) > 1$. De cette façon, les points intérieurs sont favorisés par rapport aux points situés sur les bordures. La pénalité logarithmique est une « fonction barrière » de ce fait, elle n'est pas définie quand $g(x) < 0$ (Figure 1.14). Pour éviter des problèmes de convergence, le point initial doit être pris dans la région faisable et R doit être positif. Ce dernier est réduit après chaque itération pour approcher zéro à la fin de la routine (Reklaitis *et al.*, 1983).

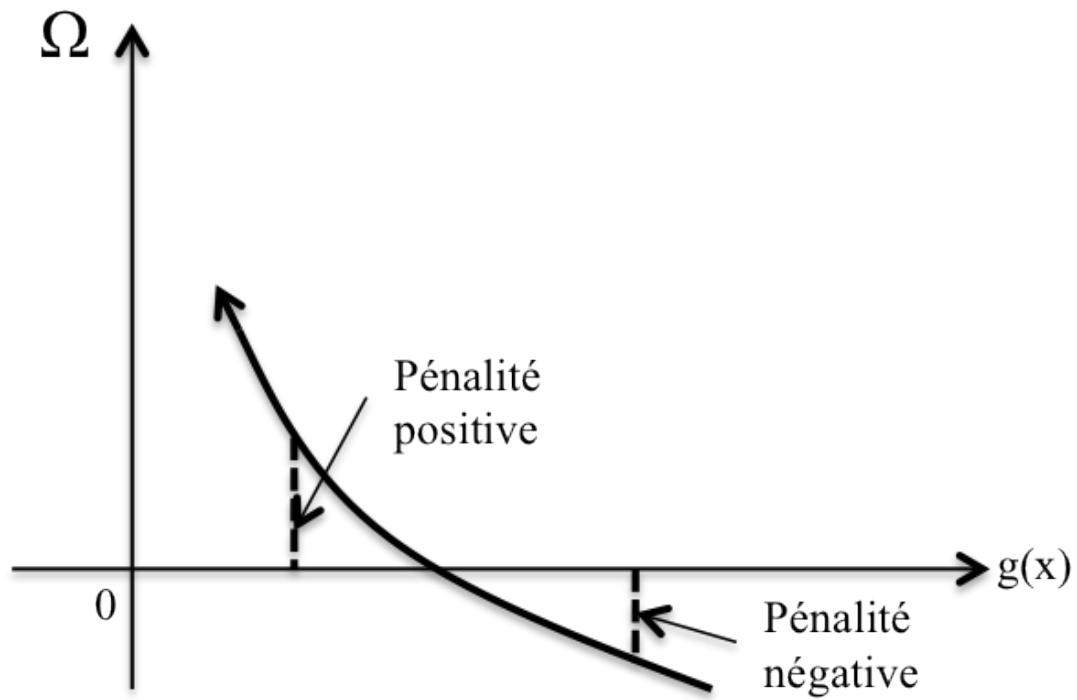


Figure 1.14 : Pénalité logarithmique. (Adaptée de (Reklaitis *et al.*, 1983))

La convergence de ces méthodes est associée à la distorsion croissante des contours de la pénalité, ce qui augmente la possibilité d'échec de l'optimisation sans contrainte de P .

Pour chaque pénalité choisie, il faut déterminer un paramètre initial R et l'ajuster après chaque recherche sans contrainte pour forcer la convergence. R est choisi de telle sorte à augmenter le poids des contraintes non respectées pour les méthodes des points extérieurs et diminuer ce poids pour les méthodes barrières.

Une fois la pénalité fixée l'algorithme schématisé dans la Figure 1.15 est appliqué afin de déterminer l'optimum

L'une des méthodes les plus efficaces pour résoudre les problèmes d'optimisation sous contrainte est la «programmation quadratique successive» (successive quadratic programming)(Edgar and Himmelblau 1988). La fonction objectif est approximée localement par une fonction quadratique et les contraintes par des contraintes linéaires, ce qui rend possible la programmation quadratique récursivement.

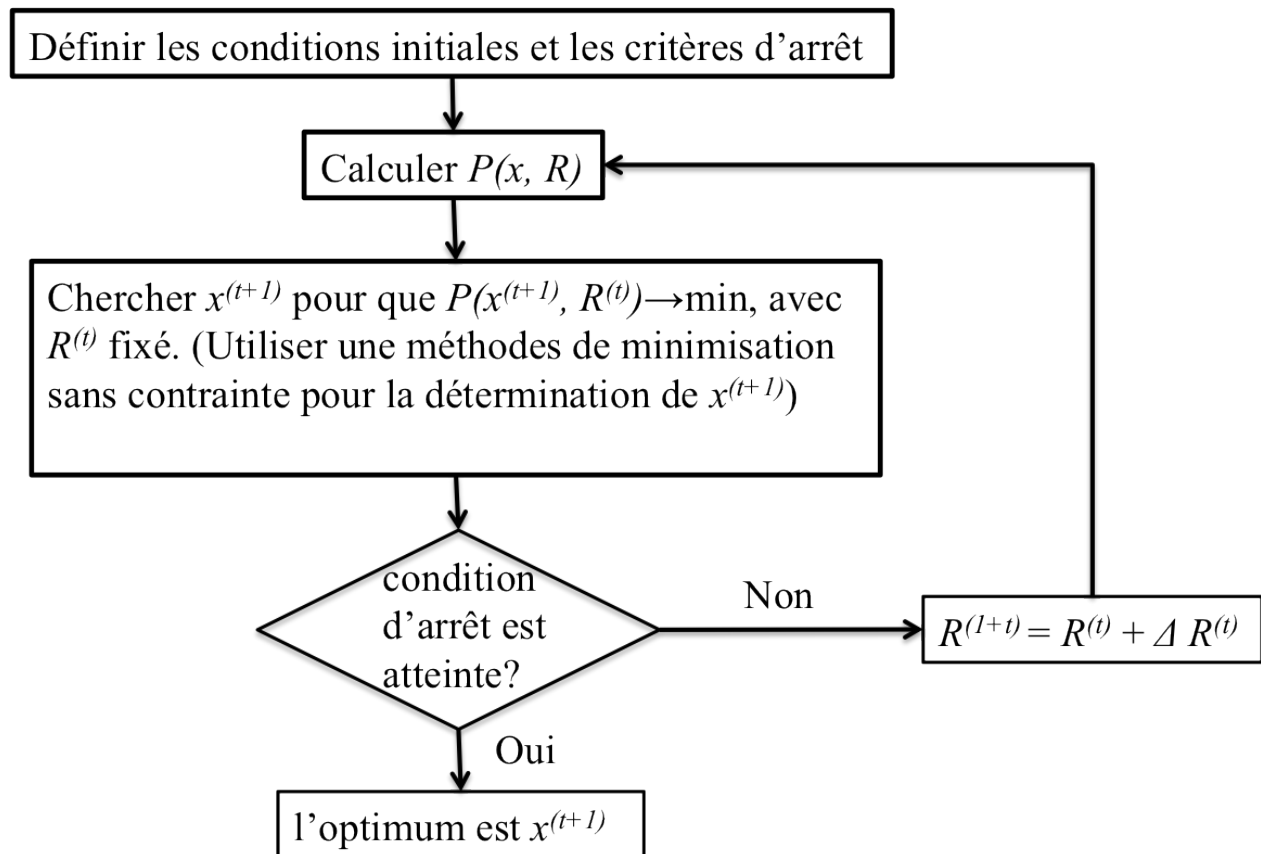


Figure 1.15 Schematisation de l'algorithme utilisé pour la résolution des problèmes d'optimisation sous contraintes non-lénares

1.8 Évaluation de la qualité des paramètres estimés

Une fois les paramètres d'un modèle déterminés, il est important d'évaluer le succès de l'identification. L'analyser des résidus (différence entre la réponse du modèle et les points expérimentaux, ces derniers doivent être aussi proche que possible du bruit) peut donner une indication. Si l'analyse des résidus n'est pas satisfaisante, des modifications sur le modèle doivent être apportées (Figure 1.12). Malheureusement, les résidus sont difficiles à interpréter. Premièrement, ils dépendent grandement du bruit ce qui rend l'établissement d'un niveau référentiel acceptable très difficile. Deuxièmement, ils ne sont pas bien adaptés pour les séries temporelles de données, comme les données récoltées avec les biocapteurs SPR, parce qu'il y a une forte corrélation entre les données récoltées au voisinage du même temps. Cependant, si l'écart type des résidus est proche de la magnitude du bruit, le modèle décrit les données expérimentales. Par contre, une valeur plus grande ne veut pas dire nécessairement que le modèle ne décrit pas les données. Cette erreur supplémentaire peut être due aux changements brusques du signal lors du passage d'une solution à une autre (tampon/analyte/tamoin) ou à la présence de microbulle d'air. Dans l'absence d'une meilleure mesure de l'exactitude, on doit se fier à une inspection visuelle des résidus (Ö'nell and Andersson 2005). Il y a deux raisons principales d'erreur lors de l'ajustement du modèle aux données. La plus commune est l'inadéquation du modèle utilisé (le modèle ne décrit pas l'interaction). La deuxième raison est due à l'existence de minima locaux où la procédure de minimisation s'est arrêtée (Karlsson and Larsson 2004).

Une identification de paramètres rigoureuse s'accompagne de l'estimation de l'intervalle de confiance. Cette information nous permet de situer la valeur réelle du paramètre au voisinage de l'estimée. En modélisation phénoménologique, en compliquant le modèle, le nombre de paramètre augmente et l'intervalle de confiance aussi. Il existe donc un nombre maximum de

paramètres identifiables avec un niveau de confiance acceptable pour un certain nombre de points expérimentaux. Si la précision des paramètres identifiés n'est pas satisfaisante, on peut récolter plus de données expérimentales ou réduire le nombre de paramètres à estimer (Dochain and Vanrolleghem 2001). La matrice d'Information de Fisher (MIF) permet de déterminer cet intervalle de confiance. L'inverse de cette matrice représente la covariance associée au maximum de vraisemblance (Markus and William 1998; Miura, 2011) à partir de laquelle les intervalles de confiance associés à chaque paramètre estimé sont calculés. Cette matrice est calculée comme suit.

Soit le modèle dynamique suivant :

$$\dot{R} = f(R, C_A, \lambda) \quad (1.15)$$

où λ et f représentent respectivement le vecteur paramètre et les équations différentielles du modèle (modèle simple ou modèle simple avec limitation par transfert de masse).

La MIF H est calculé comme suit :

$$H = \left[\left(\frac{\partial R}{\partial \lambda} \right)^T \times \frac{\partial R}{\partial \lambda} \right] \quad (1.16)$$

H peut être calculé en intégrant les équations de sensibilité suivantes avec l'équation (1.15).

$$\left(\frac{\partial \dot{R}}{\partial \lambda} \right) = \frac{\partial f}{\partial R} \frac{\partial R}{\partial \lambda} + \frac{\partial f}{\partial \lambda} \quad (1.17)$$

Le problème avec les modèles ayant beaucoup de paramètres à estimer est la largeur de l'intervalle de confiance. Ce dernier peut être réduit soit en réduisant le nombre de paramètres, en récoltant plus de données expérimentales ou bien opter pour un design expérimental optimal (ce dernier sera étudié dans les sections suivantes).

Dans le cas des expériences SPR le niveau de confiance sur les constantes cinétiques dépend du bruit expérimental (Ober and Ward 1999), du nombre de points collectés (Dochain and Vanrolleghem 2001) et de la planification des expériences (Karlsson and Larsson 2004; Myszkka 1999). L'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer la confiance est l'erreur standard. Cette erreur est donnée par la relation suivante :

$$\xi_j = \rho\sigma \sqrt{(H^{-1})_{jj}} \quad (1.18)$$

Où ρ est une constante de proportionnalité basée sur la fonction de distribution de Student, le nombre de points utilisés et le niveau de confiance requis. σ est l'écart type du bruit, $(H^{-1})_{jj}$ le $j^{\text{ème}}$ élément de l'inverse de la MIF. Pour calculer cette dernière dans le cas du modèle simple, il faut résoudre les équations de sensibilité suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \dot{R}_{pred}}{\partial k_a} = C_A(R_{max} - R_{AB}) - (k_a C_A + k_d) \frac{\partial R_{pred}}{\partial k_a} \\ \frac{\partial \dot{R}_{pred}}{\partial k_d} = -R_{AB} - (k_a C_A + k_d) \frac{\partial R_{pred}}{\partial k_d} \\ \frac{\partial \dot{R}_{pred}}{\partial R_{max}} = k_{on} C_A - (k_a C_A + k_d) \frac{\partial R_{pred}}{\partial R_{max}} \\ \left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \dot{R}_{pred}}{\partial R_A} = 1 \text{ si } C_A \neq 0 \\ \frac{\partial \dot{R}_{pred}}{\partial R_A} = 0 \text{ sinon} \end{array} \right. \end{array} \right. \quad (1.19)$$

Ce système d'équation est résolu avec l'équation (1.1).

Les variances des paramètres estimés par la méthode des moindres-carrées sont proportionnelles à l'inverse de la diagonale de la MIF. Cette dernière est essentielle pour l'estimation de la confiance sur les paramètres du modèle et de surcroit pour la prédiction de l'expérience optimale. En effet, si on arrive à prédire des expériences qui maximise cette matrice, le niveau de confiance des paramètres sera certainement élevé (Atkinson and Donev

1992). Les différentes méthodes utilisées pour atteindre ce but seront discuté dans la section suivante.

1.9 Planification optimale des expériences

Le but d'une planification expérimentale est l'identification des paramètres avec une confiance acceptable, un temps expérimental et un coût raisonnable. Une planification expérimentale non-optimale nécessite plus d'expériences pour identifier les paramètres avec une confiance acceptable, ce qui augmente le temps d'expérience et le coût. Pour une identification fiable des paramètres d'un modèle, il faut trouver des plans expérimentaux qui maximise la MIF (Atkinson and Donev 1992). Pour arriver à cette fin, il faut choisir un critère. Le critère le plus commun est la maximisation du déterminant de la MIF, *D-Optimality*. Cette maximisation permettra de minimiser les éléments de l'inverse de la diagonale de la MIF et par ricochet les variances des paramètres estimés ce qui augmente la confiance sur les paramètres (Hong and Harris 2002; John, 1975). Un autre critère consiste en la minimisation directe de la variance des paramètres estimés, *G-optimality* (Smith 1918). D'après le théorème général d'équivalence de Kiefer et Wolfowitz ces deux critères sont équivalents (Kiefer 1974; Kieffer and Wolfowitz 1960). Ces deux critères sont les plus utilisés, cependant il existe d'autres critères : « The A-Optimality » minimise la moyenne de la variance, ce qui revient à maximiser la trace de l'inverse de la matrice de Fisher : $\max (\sum \lambda_i)$. (Atkinson and Donev 1992).

Dans le cas des expériences SPR, Ö'nell et Andersson (Ö'nell and Andersson 2005) ont pu identifier les plages de concentration où il est préférable de travailler, soit : 10 μ M-10nM. En prenant 10 injections dans cette plage, ils ont pu observer que le temps d'expérimentation peut être réduit en choisissant adéquatement 2 injections parmi les 10, tout en gardant un niveau de

confiance semblable. Dans le même esprit, (De Crescenzo *et al.*, 2008b), ont mis au point un algorithme pour la détermination de ces deux concentrations afin de déterminer les constantes cinétiques avec une confiance acceptable. Cette technique est basée sur la résolution d'un problème d'optimisation qui permet de réduire l'intervalle confiance à un seuil acceptable tout en minimisant le temps d'expérience et la consommation de matériel. De fait, cette technique s'inspire des critères cités ci-haut sans les appliquer directement.

Pour la détermination de l'expérience optimale (De Crescenzo *et al.*, 2008b) ont mis au point un algorithme afin d'évaluer la durée d'injection de la phase d'association et de dissociation ainsi que la concentration de l'analyte qui seraient optimales. Le problème d'optimisation est alors défini comme suit :

$$\begin{aligned} \min_{t_a, t_d, C_A} (t_a + t_d) \quad & \text{Sous les contraintes :} \\ \left\{ \begin{array}{l} \xi_a \leq \beta_a, \xi_d \leq \beta_d, t_a + t_d \leq T_{max} \\ C_A t_a \leq \eta_{max}, C_A \leq C_{max} \end{array} \right. \end{aligned} \quad (1.18)$$

Où t_a et t_d sont respectivement les temps d'association et de dissociation de l'expérience, C_A la concentration de l'analyte à injecter, β_a, β_d sont les erreurs désirées sur les paramètres, C_{max}, η_{max} la concentration et la quantité d'analyte maximale à utiliser respectivement et T_{max} le temps maximal allouée à l'expérience.

Pour résoudre ce problème d'optimisation il faut connaître les constantes cinétiques, cependant ces dernières ne sont pas connues (si elles étaient connu, l'expérience pour les déterminer n'aurait pas lieu d'être !). Pour la détermination de ces constantes (De Crescenzo *et al.*, 2008b) ont mis au point l'algorithme suivant ou les étapes 1 et 2 permettent d'obtenir une première estimation des paramètres cinétiques nécessaire pour la suite de l'algorithme :

1. Réaliser une première expérience non optimisée avec un t_a , t_d et C_A choisis arbitrairement.
2. Calculer les paramètres k_a , k_d et l'erreur associée en utilisant le modèle simple.
3. Optimisation de la deuxième expérience en résolvant le problème (1.18)
4. Si il n'y a pas de solution, augmenter le nombre d'expériences optimales jusqu'à convergence.
5. Une fois une solution obtenue, réaliser les expériences optimisées.
6. Recalculer les paramètres et l'erreur en tenant en compte des expériences optimisées et non optimisées.
7. Si l'erreur finale ne satisfait pas, refaire les étapes 3-6.

CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

De nos jours la résonance plasmonique de surface est la méthode de choix pour l'étude de des interactions entre molécules en biologie structurale, ingénierie des protéines et dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques. Cependant, l'expérimentation SPR classique est relativement lente et coûteuse. La préparation et le traitement de plusieurs échantillons peuvent prendre plusieurs heures. Des équipements SPR (« SPR array ») ont été développés pour analyser les interactions entre un analyte et plusieurs ligands, améliorant la vitesse de criblage des échantillons (Rich et Myszka. (2007). Cependant, la qualité des constantes cinétiques calculées à partir de ces équipements n'est pas satisfaisante. Ö'nell et Andersson (2005) ont montré que des constantes cinétiques fiables peuvent être déterminées en utilisant sensiblement moins de données que ce que l'expérimentation classique exige. En effet, les utilisateurs du BIACORE effectuent 5 à 10 injections en variant la concentration. Ces chercheurs ont montré que deux injections sont suffisantes pour avoir une confiance équivalente à celle obtenue à partir de l'expérimentation classique. Le secret réside dans le choix des deux injections. Ce choix dépend des constantes cinétiques. De Crescenzo *et al.* (2008b) ont mis en œuvre un algorithme, basé sur une optimisation numérique sous contraintes, qui permet de choisir ces deux injections. L'implémentation de cette méthode permet de caractériser les constantes cinétiques en réduisant drastiquement le temps d'expérimentation et la consommation de matériel tout en gardant un niveau de confiance égal à l'expérimentation classique. Cette méthode permet d'augmenter la

vitesse de criblage des échantillons tout en gardant une très bonne confiance sur les paramètres identifiés. Cependant cette méthode est restreinte aux interactions décrites par un modèle simple.

En se servant de ces travaux comme point de départ, cette thèse de doctorat explore de nouvelles avenues afin d'augmenter la capacité de criblage des biocapteurs SPR. Ainsi, nous avons dans un premier temps émis et vérifié l'hypothèse que l'injection simultanée de plusieurs analytes, couplée à une méthode d'optimisation numérique, peut augmenter considérablement la vitesse de criblage. D'un autre côté, il a été clairement souligné dans la revue de littérature que le phénomène de limitation par transfert de masse peut avoir un effet considérable sur le processus de détermination des constantes cinétiques même lorsque les expériences sont effectuées à basse densité et haut débit (Schuck et al. (1996), Bowles et al.(1997), Myszkowski et al. (1997), Karlsson, R. (1999)). Un modèle simple n'est donc pas toujours adéquat pour décrire des interactions biologiques simples. Afin d'augmenter l'applicabilité de l'approche proposée par De Crescenzo et collègues, un algorithme permettant d'optimiser l'expérimentation SPR tout en utilisant le bon modèle (modèle de Langmuir avec ou sans limitation par transfert de masse) a aussi été développé.

Le chapitre 3 de cet thèse présente donc les travaux publiés dans le journal scientifique « *Journal of Molecular Recognition* » en 2012. Ces travaux étudient la possibilité d'injecter de façon simultanée deux analytes sur une surface active. L'objectif était d'augmenter la vitesse de criblage. L'interaction entre les analytes et le ligand a été modélisée et les constantes cinétiques identifiées ont été validées. Un algorithme d'optimisation exploitant l'injection de plusieurs analytes a été développé et nous avons démontré que cet algorithme augmente de façon significative la vitesse de criblage.

Les travaux présentés dans le deuxième article de cette thèse (Chapitre 4) et soumis pour publication dans *Analytical Biochemistry* reviennent sur le modèle décrivant l'interaction entre deux analytes et le ligand. Ce modèle a été développé en se basant sur la proportionnalité entre le signal SPR et le poids moléculaire. Dans cet article nous avons démontré que cette proportionnalité n'est pas valide dans le cas des composés à faible poids moléculaire. Partant de cette conclusion nous avons proposé un nouveau modèle qui décrit l'interaction entre multiples analytes et le ligand. Les conclusions du premier article relatives à l'augmentation de la vitesse de criblage restent valables pour ce nouveau modèle.

Dans le troisième article (Chapitre 5) soumis pour publication dans « *Journal of Molecular Recognition* », nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de l'expérimentation SPR tout en tenant compte de la limitation par transfert de masse. L'algorithme développé par De Crescenzo et al. (2008)b est basé sur le modèle simple qui ne tient pas compte de limitation par transfert de masse. Nous avons d'abord démontré que l'implémentation directe du modèle qui tient compte de la limitation par transfert de masse n'est pas possible pour traiter les cas de Figure où cette limitation n'est pas présente car les expériences deviennent trop longues et dans certains cas, la confiance sur les constantes cinétiques n'est pas respectée. L'algorithme proposé dans cet article, basé sur la discrimination de modèle et l'optimisation, choisit le modèle qui décrit l'interaction tout en optimisant l'expérience, évitant ainsi la récolte inutile de données expérimentales et des constantes cinétiques biaisées sans affecter la vitesse de criblage.

La méthode présentée dans l'annexe de cette thèse et publiée dans *Analytical Biochemistry* en 2011 décrit une approche pour la quantification de molécule en utilisant la SPR sans courbe de calibration que nous avons développée en parallèle de la poursuite des objectifs principaux de cette thèse. Cette méthode simple et rapide exploite le modèle qui décrit l'interaction

ligand/analyte, la connaissance préalable des constantes cinétiques et la répétabilité des résultats de la SPR. Les résultats montrent que cette méthode réduit drastiquement le temps d'expérience et la consommation de matériel. Cette méthode est idéale pour cribler plusieurs échantillons de concentrations inconnues ou le suivi en ligne de la production d'un bioréacteur.

CHAPITRE 3 AUGMENTATION DE LA VITESSE DE CRIBLAGE DE RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE PAR INJECTION DE PLUSIEURS ANALYTES

3.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé **"Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections "**. L'article a été publié dans la revue *Journal of Molecular Recognition* en 2012 (Vol. 25 No. 4 : p208–p215).

La mise au point d'approches permettant de réduire le temps d'expérience et la consommation de matériel est primordiale afin d'augmenter la vitesse de criblage de la SPR ce qui rendrait la méthode très performante, spécialement dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques. Dans cette étude une méthode basée sur l'injection de deux analytes simultanément. Les interactions entre le ligand et les analytes ont été modélisées et le modèle validé expérimentalement. Une méthode d'optimisation numérique sous contrainte non linéaire a été appliquée à cette méthode afin d'augmenter sa vitesse de criblage. L'approche optimisée de l'injection de plusieurs analytes a été comparée à l'approche classique optimisée, des gains en considérables en consommation de matériel et vitesse de criblage ont été observée.

3.2 Increasing Throughput of Surface Plasmon Resonance-based Biosensors by Multiple Analyte Injections

RUNNING TITLE: Multiple analyte injections in SPR

AUTHORS

Massinissa Si Mehand, Gregory De Crescenzo* and Bala Srinivasan*

Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal. P.O. Box 6079, Centre-ville Station, H3C 3A7 Montréal, Québec, Canada

* Both authors equally contributed to this work. To whom all correspondence should be sent.

BS: Tel: (514)-340-4711 x7472, Fax: (514)-340-2990 E-mail address:
bala.srinivasan@polymtl.ca

GDC: Bio-P² Unit Tel: (514)-340-4711 x7428, Fax: (514)-340-2990. E-mail address:
gregory.decrescenzo@polymtl.ca

3.2.1 ABSTRACT

Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensors are now acknowledged as robust and reliable instruments to determine the kinetic parameters related to the interactions between biomolecules. These kinetic parameters are used in screening campaigns: there is thus a considerable interest in reducing the experimental time and thus improve the throughput of the SPR assays. Kinetic parameters are typically obtained by analysing data from several injections of a given analyte at different concentrations over a surface where its binding partner has been immobilized. It has been already proven that an iterative optimization approach aiming at determining optimal analyte injections to be performed online can significantly reduce the experimentation time devoted to kinetic parameter determination, without any detrimental effect on their standard errors. We here explore the potential of this iterative optimization approach to further reduce experiment duration, by combining it with the simultaneous injection of two analytes.

KEYWORDS: multiple analyte injections; surface plasmon resonance; biosensor; online optimization; kinetics.

3.2.2 INTRODUCTION

Within the last two decades, surface plasmon resonance (SPR)-based biosensing has become the technique of choice to study the interactions between macromolecules (Danielson 2009; De Crescenzo *et al.*, 2008a; Rich and Myszka 2010; Tanious *et al.*, 2008). This would not have been possible without the achievement of remarkable progress providing researchers with fully automated (Rich and Myszka 2007), more sensitive SPR instruments (Myszka 2004; Papalia *et al.*, 2006) in addition to optimized experimental protocols (De Crescenzo *et al.*, 2008b; Karlsson *et al.*, 2006; Myszka 1999) and robust data analysis software packages (Gorshkova *et al.*, 2008; Myszka and Morton 1998; O'Connor-McCourt *et al.*, 1998) aiming at fully exploiting the potential of real-time measurement for a better characterization of macromolecular interactions.

Of interest, in an effort to integrate SPR biosensors as early as possible in the drug development process, the latest SPR-based biosensor developments have been directed to combining the flexibility and information-rich measurements of SPR systems to the high-throughput capacity of standard *in vitro* assays such as ELISA or *in vitro* cell assays. Hence, a new generation of biosensors allowing for testing one sample against up to 400 targets, or testing multiple samples onto multiple surfaces in parallel has come into place (Rich and Myszka 2007). These new devices have already been reported to be extremely useful in the new field of proteomics. But the quality of the kinetic analyses with these new tools is usually poorer than with the classical low throughput instruments.

With the low throughput systems, users often report globally analyzed data corresponding to 5-to-10 different injections with varying analyte concentrations over a range of concentrations

as wide as possible. In an effort to reduce experimentation time, kinetic titration series protocols (corresponding to successive injections of soluble species without any in-between injections for regeneration) have been proposed and validated (Karlsson *et al.*, 2006). Of interest, it was shown by Önell and Andersson (2005) that, in most cases, data derived from only 2 classical injections are sufficient to get the same level of confidence on the kinetic parameters as that obtained from the global analysis of entire data sets. De Crescenzo *et al.* (2008b) also demonstrated that the information-rich nature of real-time data from SPR biosensors can be exploited, in combination with a careful, fully-automated experimental design to get comparable accuracy and confidence on kinetic parameters as those derived from non-optimized (i.e., time and material consuming) experimental data sets traditionally collected. Indeed, in perfect agreement with conclusions from Önell and Andersson, these results indicated that, when the interactions follow a simple mode of binding, one or two carefully planned injections are enough to reach confidence levels similar to those derived from non-optimized experimental data.

In this work, the optimization of kinetic experiments for the reduction of experimental time is taken one step further. That is, traditionally, kinetic parameters are estimated for one injected species at a time. The main question asked in this study is whether or not, for a given level of confidence, one can reduce the experimental time by injecting two analytes simultaneously. By doing so, the kinetic model to be applied becomes more complicated as the number of parameters to be identified increases and the confidence on the parameters decreases. So, *a priori*, there is no intuitive evidence that the injection of more than one analyte would indeed decrease the experimental time. We here show that numerical online optimization based on confidence level and parameter estimation, combined to multiple analyte injections reduces the time of experimentation and material consumption while allowing reaching similar

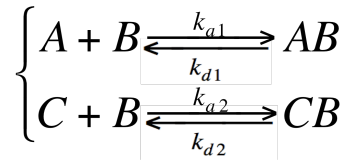
confidence on kinetic parameters. Our results strongly suggest that our approach may contribute to increase considerably the throughput of commercially available SPR-based instruments.

Theory

Modelling of the interaction

After the immobilization of one of the interacting species (the ligand) at the biosensor surface, standard experiments with Biacore instruments (the most used SPR biosensors formerly sold by Biacore Inc., now part of GE Healthcare) consist in injecting its binding partner (the analyte), followed by the injection of a buffer solution to monitor the formation and dissociation of the ligand/analyte complexes, respectively. If the dissociation is not complete, an additional step called the regeneration step must be included in the protocol. All these steps (complex formation, dissociation and regeneration) form a sensorgram. Several sensorgrams can be obtained by varying the length of the analyte/buffer injections as well as the analyte concentration.

In this study, two analytes named A and C, are injected at known concentrations over a surface where their binding partner, the ligand B, had been previously immobilized. This results in the formation of two non-covalent complexes AB and CB. Assuming that the interactions are Langmuirian, the following scheme describes what occurs at the biosensor surface:



where k_{a1} and k_{a2} are the related association rate constants expressed in $M^{-1}s^{-1}$, k_{d1} and k_{d2} are the dissociation rate constants of the interactions expressed in s^{-1} . The interactions are followed by monitoring the mass accumulation of the resulting products AB and CB (in RU). Assuming that

each ligand interacts with one analyte only and that no interaction occurs between the analytes, the following set of equations can thus be derived, using simple mass balances:

$$\begin{cases} \frac{dC_{AB}}{dt} = k_{a1}C_A(C_{B0} - C_{AB} - C_{CB}) - k_{d1}C_{AB}, & C_{AB}(0) = 0 \\ \frac{dC_{CB}}{dt} = k_{a2}C_C(C_{B0} - C_{AB} - C_{CB}) - k_{d2}C_{CB}, & C_{CB}(0) = 0 \end{cases} \quad (3.1)$$

where C_A , C_C are the concentrations of free analytes A and C, C_{B0} is the concentration of the ligand B at the beginning of the interaction, C_{AB} and C_{CB} are the concentration of the complexes AB and CB respectively (in M).

Since detection is proportional to mass accumulation (in RU) at the biosensor surface, let us define the mass accumulations of A and C respectively to be R_1 and R_2 , i.e. $R_1 = \alpha C_{AB} M_1$, $R_2 = \alpha C_{CB} M_1$, where M_1 and M_2 , are the molecular weights of A and C, respectively and α a proportionality factor. Also, the quantity of B is expressed in terms of R_{max} which is the maximal amount of analyte A that can specifically bind to the surface (in RU), i.e. $R_{max} = \alpha C_{B0} M_1$.

$$\begin{cases} \frac{dR_1}{dt} = k_{a1}C_A(R_{max} - R_1 - R_2 \frac{M_1}{M_2}) - k_{d1}R_1 \\ \frac{dR_2}{dt} = k_{a2}C_C(\frac{M_2}{M_1}R_{max} - \frac{M_2}{M_1}R_1 - R_2) - k_{d2}R_2 \\ R_1(0) = 0 \text{ and } R_2(0) = 0 \end{cases}$$

(1) $\Rightarrow R_T = R_1 + R_2$ (3.2)

$$R = \begin{cases} R_T + R_{TC} & \text{if } C_A, C_C \neq 0 \\ R_T & \text{If } C_A, C_C = 0 \end{cases}$$

R_{TC} is a correction factor (in RU) that is added to take into account refractive index artefacts that are often observed at the beginning of each phase of a sensorgram even after control correction of the signal. R is the resulting recorded signal in RU .

Parameter identification problem

In order to identify the parameters k_{a1} , k_{a2} , k_{d1} and k_{d2} , a series of experiments with varying concentrations of analytes A and C are performed. Each experiment consists of an on-period (analyte injection) t_a and an off-period (buffer injection) t_d . From the experimental data, the following least squared identification algorithm is used to compute the required parameters:

$$\min_{k_{a1}k_{a2}k_{d1}k_{d2}R_{max}R_{TC}^i} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{P_i} (R_{meas}^i(j) - R_{pred}^i(j))^2 \quad (3.3)$$

where N is the number of sensorgrams, P_i the number of data points in sensorgram i , R_{meas} the measurements, and R_{pred} the prediction from the model presented above. k_{a1} , k_{a2} , k_{d1} , k_{d2} and R_{max} are defined as global parameter whereas R_{TC}^i is a local parameter related to each sensorgram.

Confidence and standard error

Confidence in the identified parameters is an important indicator of the accuracy of the identification procedure. Confidence is a function of three important factors: the measurement noise, the number of measurements, and the experimental planning. The most common way of expressing the confidence ξ_j in parameter j , in this domain, is the standard error (De Crescenzo *et al.*, 2008b; Ö'nell and Andersson 2005):

$$\xi_j = \rho \alpha \sqrt{(H^{-1})_{jj}} \quad (3.4)$$

where ρ is a proportionality constant based on the F -student distribution, the number of points used and the level of confidence that is requested, σ the standard deviation of the measurement

noise a_{jj} , the j^{th} diagonal element of the inverse of the Hessian matrix H . The Hessian matrix is given by:

$$H = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{M_i} \left(\frac{\partial R_{pred}^i(j)}{\partial \theta} \right)^T \left(\frac{\partial R_{pred}^i(j)}{\partial \theta} \right) \quad (3.5)$$

The matrix H can be approximated by the square of the first order sensitivities assuming small deviations and linearity around the optimal point.

Calculation of the Hessian

To calculate the standard error, it can be seen that obtaining the Hessian is crucial. The calculation of the H matrix involves solving the following differential equations along with the mathematical model that describes the interactions:

$$\begin{aligned} \frac{\partial R_{pred}}{\partial \theta} &= \frac{\partial R_1}{\partial \theta} + \frac{\partial R_2}{\partial \theta} \\ x &= (R_1, R_2) \\ \frac{dx}{dt} &= f(x, \theta) \\ \frac{d}{dt} \frac{dx}{d\theta} &= \frac{\partial f}{\partial x} \frac{\partial x}{\partial \theta} + \frac{\partial f}{\partial \theta} \\ x(0) &= (R_1(0), R_2(0)) = (0, 0), \quad \frac{\partial x}{\partial \theta} = 0 \end{aligned} \quad (3.6)$$

where f represent the differential equations of model (3.2).

Optimization of experiments

As discussed in the introduction, it has been shown that time and material consumption can be reduced drastically when De Crensenzo's optimized method is applied (2008b). In this paper, we made the hypothesis that the combination of multiple analyte injections and online

optimization will take the improvement one step further and increase the throughput of SPR biosensors. The online optimization algorithm that is presented here was inspired by De Crescenzo *et al.*, 2008. These authors developed a method based on solving an optimization problem, where the objective function is the time of the experiment, and the confidence on kinetic parameter acts as a constraint. For a single analyte, the optimization problem was defined as follows:

$$\begin{aligned} \min_{\theta} (t_a + t_d), \quad \theta = [t_a, t_d, C_A] \\ \begin{cases} \xi_a \leq \beta_a, \xi_d \leq \beta_d, t_a + t_d \leq T_{\max} \\ t_a \leq t_{a \max}, C_A \leq C_{A \max} \\ t_d \leq t_{d \max} \end{cases} \end{aligned} \quad (3.7)$$

where t_a and t_d are the association and the dissociation periods of the experiment, respectively; C_A the concentration of analyte, β_a and β_d are the desired standard errors in estimated parameters k_a and k_d , respectively; $t_{a \max}$ and $t_{d \max}$ are the maximum association and the dissociation periods allowed, respectively; $C_{A \max}$ the maximum concentration of analyte allowed to be used and T_{\max} the maximum total time allowed for the experiment. The standard errors ξ_a and ξ_d are computed based on the Hessian information. The desired standard errors β_a and β_d are chosen to satisfy a high level of confidence.

Since the values of k_a and k_d are not known, the optimization problem was solved based on a previous non-optimized injection that allows the estimation of k_a and k_d . The algorithm proposed by De Crescenzo *et al.* was written as follows:

1. Perform an injection with arbitrarily chosen t_a , t_d and C_A .
2. Compute the parameter values k_a , k_d and the associated standard errors.
3. Optimize the second experiment by numerically solving the optimization problem presented in equation (3.7).

4. If the optimization does not lead to a feasible solution, increase the number of experiments in the optimization formulation, until a feasible solution is obtained.
5. Once a feasible solution is found, perform the second set of optimized experiments.
6. Compute the parameter values and the associated standard errors taking the data from the two sets of experiments (i.e. non-optimized and optimized injections) into account.
7. If the final obtained standard errors are not satisfactory repeat steps 3-6.

A similar algorithm can be formulated for multiple analyte injections. The steps are similar; the only variations are in Steps 1 and 3.

The new Step 1 is formulated as follows: perform an injection of analytes A and C separately with arbitrarily chosen t_a , t_d , C_A and C_C .

In the new Step 3, the following optimization problem replaces (3.7):

$$\begin{aligned} \min_{\theta} (t_a + t_d), \quad \theta = [t_a, t_d, C_A, C_C] \\ \begin{cases} \xi_a \leq \beta_a, \xi_d \leq \beta_d, t_a + t_d \leq T_{\max} \\ t_a \leq t_{a \max}, C_A \leq C_{A \max} \\ t_d \leq t_{d \max}, C_C \leq C_{C \max} \end{cases} \end{aligned} \quad (3.8)$$

Model (3.2) is used to solve the optimization problem (3.8). It might also happen that the problem (3.8) has no feasible solution. Then, as explained in Step 4 of the algorithm, two (or more) injections would be needed with varying concentrations for each of the injection. The optimization problem can be written as follows:

$$\begin{aligned} \min_{\theta} (t_a + t_d), \quad \theta = [t_a, t_d, C_{A1}, C_{C1}, C_{A2}, C_{C2}] \\ \begin{cases} \xi_a \leq \beta_a, \xi_d \leq \beta_d, t_a + t_d \leq T_{\max} \\ t_a \leq t_{a \max}, C_{A1}, C_{A2} \leq C_{A \max} \\ t_d \leq t_{d \max}, C_{C1}, C_{C2} \leq C_{C \max} \end{cases} \end{aligned} \quad (3.9)$$

To facilitate double referencing (subtraction of sensorgram corresponding to buffer injection) the association and dissociation times for the two additional injections are kept the same.

3.2.3 MATERIALS AND METHODS

Materials

Experimental data were generated with a BIACORE T100 optical biosensor equipped with research-grade CM5 sensor chips (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC). HBS-EP buffer, acetate buffer and ethanolamine were purchased from GE Healthcare. N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), carbonic anhydrase isozyme II (CAII) that had been purified from bovine erythrocytes, 4-carboxybenzenesulfonamide (CBS), sulfanilamide, 1,3-benzenedisulfonamide (BDS), and phosphate buffer saline (PBS, 10 mM, pH 7.4) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON).

Biosensor surface preparation

Biosensor surface preparation (CAII and blank surfaces) was performed according to published protocols (Navratilova *et al.*, 2007). CAII surfaces were prepared at density of 4308 RU and 4533 RU. After CAII immobilization or blank surface generation, the system was extensively primed with running buffer (HBS-EP).

BIACORE sample injections

Single analyte injections

Prior to analyte injections, 3 prime procedures and buffer injections were performed to stabilize the baseline of the instrument. Analyte samples were injected in duplicate at a flow rate of 100 μ l/min with a data collection rate set at 10 Hz, at 12 and 18 °C. Analyte samples were diluted in HBS-EP running buffer from stocks solution (1.76 mM for CBS, 0.87 mM for BDS and 1.86 mM for sulfanilamide) prepared in PBS buffer. For preliminary classical kinetic

experiments, CBS and sulfanilamide samples at concentrations comprised between 264.90 nM and 52.98 μ M or 251.37 nM and 50.27 μ M respectively, in addition to 6 buffer solutions (for double referencing purpose), were injected for 60 s across both control and CAII surface, followed by a 350 s injection of HBS-EP running buffer at 18 °C. The same experiments were performed at 12 °C. BDS samples were injected at concentrations comprised between 52.47 nM and 10.49 μ M, in addition to 6 buffer solutions (for double referencing purpose), at the same association and dissociation time. As complete dissociation was observed in each case, no regeneration procedure was performed, in agreement with previous reports (Day *et al.*, 2002; Navratilova *et al.*, 2007).

Multiple analyte injections

Analytes were combined at different temperature to create four case studies: i) k_{a1} , k_{a2} are similar and k_{d1} , k_{d2} are similar (CBS-sulfanilamide at 18 °C), ii) k_{a1} , k_{a2} are different and k_{d1} , k_{d2} are similar (BDS-sulfanilamide at 12 °C), iii) k_{a1} , k_{a2} are similar and k_{d1} , k_{d2} are different (CBS-sulfanilamide at 12 °C), iv) k_{a1} , k_{a2} are different and k_{d1} , k_{d2} are different (CBS-BDS at 12 °C). Different combinations of analyte concentrations were taken to cover the domain of concentrations of the analytes.

Experimental plan

To verify the validity of model (3.2), various experiments were performed according to the case studies. For each case study a classical experiment was performed for each separate analyte. Kinetics were computed and compared with those driven by multiple analyte injections. In addition, to validate the optimized multiple analyte injection approach and to compare it to the approach previously developed by De Crescenzo *et al.*, optimized experiments were performed for both methods.

Data analysis

In the case of classical method, data sets were analyzed with BIACORE T100 evaluation software, Biaevaluation 1.1.1, for kinetic determination. For multiple analyte injections and optimized experiments (method by De Crescenzo *et al.* (2008b)) and the multiple analyte optimized method described here) analysis, an in-house software package was developed with the MATLAB 7.7.0.471 (R2008b) software platform (The Mathworks, Natick, USA) using the kinetic model described in (3.2) and a Langmuirian model for the optimized single analyte experiments. The least-square problem presented in (3.3) was solved with the standard simplex program; the optimization problems were solved by sequential quadratic programming, both being available in the optimization Toolbox 4.1 of Matlab.

In the case of multiple analyte injections, for fast and sure convergence, the sensorgrams corresponding to $(C_{Amax}, 0)$ and $(0, C_{Cmax})$ were fitted first (these couples correspond to the injection of A and C, respectively, alone at the highest concentration) with a simple Langmuirian model. The result is taken as a starting point to fit all data. For the optimal multiple injection approach, as well as for the optimized single analyte approach described by De Crescenzo *et al.* (2008b), the non-optimal parameters computed at step 2 of the above algorithm are used as a starting point for a fast and sure convergence.

3.2.4 RESULTS AND DISCUSSION

Experimental data collection and kinetic analysis

We assumed that the simultaneous injection of two analytes over the same ligand surface will allow for an efficient identification of the kinetic parameters related to each analyte (values, and related confidence) while reducing experimental time when compared to approaches relying on separate injections of each analyte. To verify this hypothesis, sets of experiments were performed. In each experiment, the interactions of small molecular weight compounds (CBS, Sulfanilamide and BDS) with their binding partner (CA II) were studied at 12°C and 18°C. These biological systems were selected since they had already been extensively studied by SPR and had demonstrated to follow a simple Langmuirian kinetic model (Day *et al.*, 2002; Navratilova *et al.*, 2007).

At first, to compute the kinetic parameters of each analyte with CAII, classical non-optimized experiments were performed to cover the case studies i, ii, iii and iv (see the ‘Multiple Analyte Injection’ section of the Material and Methods). Data sets were control-corrected, doubled-referenced and globally analyzed using a simple Langmuirian model available in Biaevaluation 1.1.1. Excellent fits were obtained, as shown in Figure 3.1. The corresponding identified kinetic parameters are reported in Table 3.1.

Model validation

We first compared the kinetic parameters obtained using a single analyte injection approach with those corresponding to the multiple analyte injection technique (non optimized in each case). Solutions containing two analytes (CBS-sulfanilamide at 18°C, CBS-sulfanilamide at 12°C, CBS-BDS at 12°C, BDS-sulfanilamide at 12°C) were injected on a CAII surface.

Concentrations for each couple were chosen to cover the domain of concentrations of each analyte. Fixed injection and dissociation times (60 and 350 s, respectively) were used for all the experiments. The generated sensorgrams were control-corrected, doubled-referenced and globally analyzed using model (3.2) with our in-house software (Figure 3.1). As for classical non-optimized approach, even after double referencing, data still presented refractive index mismatches at some injection starts (Cannon *et al.*, 2004a), due to dispersion of the sample plug during injection. Fortunately, these mismatches were taken into account by adding a local parameter included in model (3.2), R_{TC} correction factor. Good fits were obtained using this model (Figure 3.1). Moreover, this initial study indicated that kinetic parameters could be identified with a good confidence by injecting two analytes simultaneously. As shown in Table 3.1, the kinetic parameters identified by the classical method, using a 1:1 simple model, are comparable to those identified by the multiple analyte injections, using model (3.2). This leads to the conclusion that model (3.2) adequately described the interactions.

The validation was further reinforced by the optimized experiments detailed below. Table 3 showed that kinetic parameters derived from the optimized injections are comparable to those obtained from classical experiments. Kinetic parameters deviation values were in all cases below 17%.

Table 3.1. Kinetic constants for all the case-study interactions determined with Biaevaluation 1.1.1 for the classical method and with an in-house software for multiple analyte injections.

		$k_a (\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$		$k_d (\times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$	
	Case study	Classical	Multiple analyte	Classical	Multiple analyte
i	CBS/ CAII at 18 °C	2.903 ± 0.004	2.912 ± 0.005 (0.31%)**	17.27 ± 0.02	18.00 ± 0.01 (4.18%)
	Sulf*/CAII at 18 °C	1.650 ± 0.003	1.810 ± 0.006 (9.69%)	64.89 ± 0.07	63.4 ± 0.2 (2.27%)
ii	BDS/ CAII at 12 °C	7.86 ± 0.02	6.80 ± 0.02 (13.42%)	42.69 ± 0.04	50.00 ± 0.06 (17.11)
	Sulf*/CAII at 12 °C	1.239 ± 0.002	1.385 ± 0.003 (11.783%)	35.56 ± 0.03	35.18 ± 0.04 (1.05%)
iii	CBS/ CAII at 12 °C	2.050 ± 0.003	2.014 ± 0.006 (1.75%)	8.50 ± 0.01	8.82 ± 0.02 (3.88%)
	Sulf*/CAII at 12 °C	see above	1.270 ± 0.003 (2.5%)	see above	32.08 ± 0.04 (9.79%)
iv	CBS/ CAII at 12 °C	see above	2.255 ± 0.006 (10%)	see above	8.65 ± 0.01 (1.71%)
	BDS/ CAII at 12 °C	see above	7.754 ± 0.007 (1.31%)	see above	41.55 ± 0.06 (2.66%)

*Sulf: Sulfanilamide

**Deviation from classical method

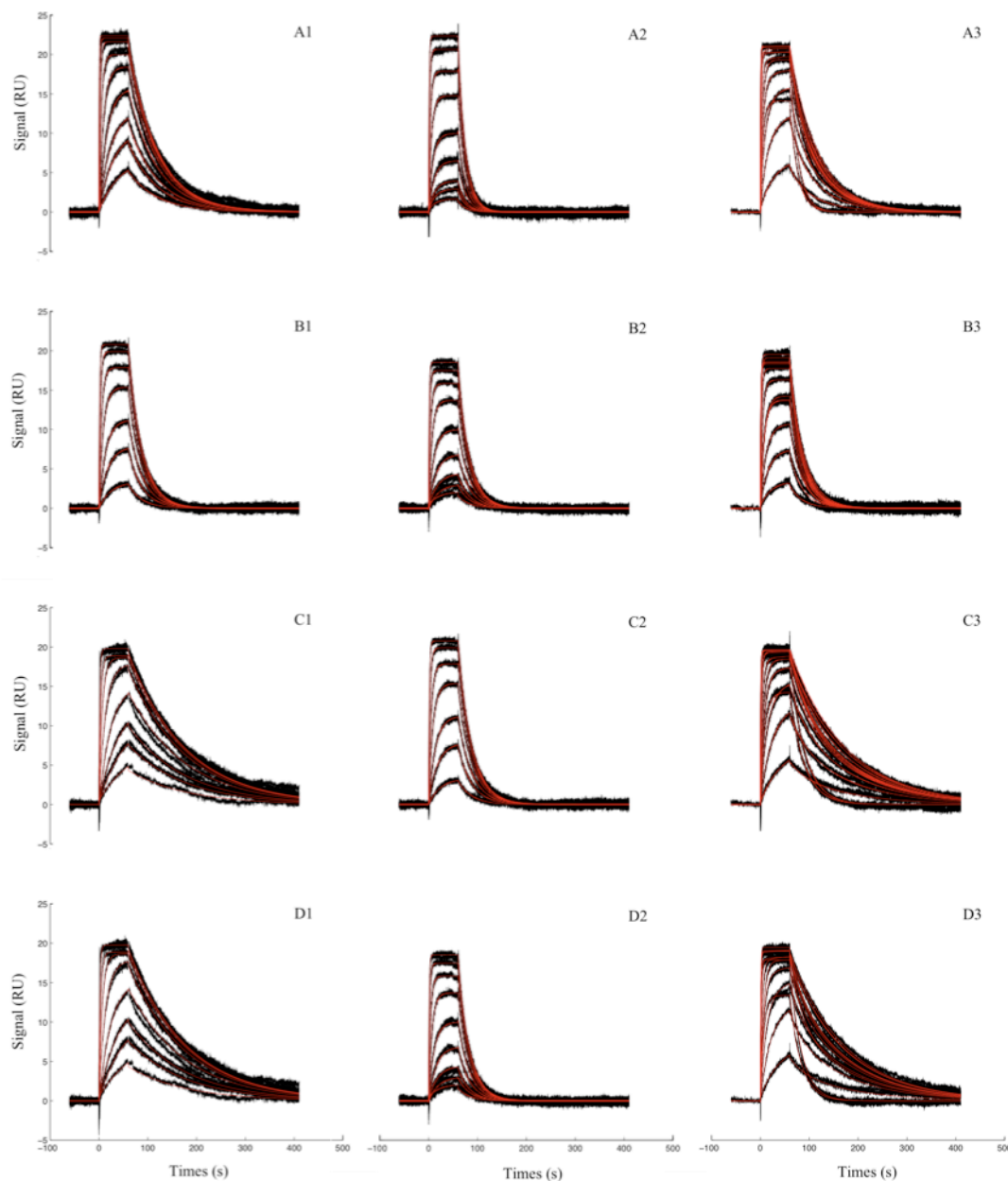


Figure 3.1. Classical kinetic analysis and multiple analyte injection analyses of CBS, BDS, and sulfanilamide binding to CAII surfaces using a BIACORE T100 biosensor.

Black dots correspond to control-corrected and double referenced sensorgrams for all case studies. Red lines correspond to the global fits with a 1:1 interaction model for classical method and model (3.2) for multiple analyte injections. Case studies i and iii: Panels A1/C1, A2/C2 and A3/C3 correspond to the injections of CBS, sulfanilamide and CBS-sulfanilamide, respectively, at 18°C/12°C. Case study ii: Panels B1, B2 and B3 correspond to the injections of BDS, Sulfanilamide and BDS-Sulfanilamide, respectively, at 12°C. Case study iv: Panels D1, D2 and D3 correspond to the interaction between CBS, BDS and CBS-BDS, respectively, at 12°C. The injections were performed on the 4308-RU CAII surface. The concentrations of CBS, sulfanilamide and BDS were varied from 264 nM to 52.981 μ M, 251 nM to 50.274 μ M and 52 nM to 10.494 μ M, respectively.

Optimized classical experiments

Optimized single analyte experiments were conducted as recommended by De Crescenzo *et al.* (2008b). First, a duplicate injection of buffer and analyte (at concentration of 1.59, 1.51 and 0.63 μM for CBS, Sulfanilamide and BDS respectively) were performed using the same experimental condition as in the classical approach. Kinetic parameters were computed from the generated sensorgrams by using a simple Langmuirian model. These kinetic parameters were then used to solve the optimization problem (3.7) presented above to predict the optimized injection(s). The optimized experiments had to satisfy the following constraints: i) the level of confidence (which was fixed at 0.5 %), ii) time of experiment (shorter than classical experiments) and iii) maximum concentration (lower than the maximal concentrations of classical experiments, 52.98, 50.27 and 10.49 μM for CBS, sulfanilamide and BDS, respectively). As expected, the optimal injections were different for each analyte (Figure 3.2) since, as previously reported (De Crescenzo *et al.*, 2008b), the optimal injections are related to the value of kinetic parameters. For CBS at 12 and 18 °C, only one optimal injection was required to get the optimization problem converged, whereas for BDS and sulfanilamide two optimal injections were needed. Once the optimization problem converged, optimized experiments were performed accordingly (Figure 3.2). The related sets of sensorgrams, including those generated from non-optimized injection, were globally analyzed to compute kinetic parameters.

Table 3.2. Kinetic constants for all the case study interactions by the different optimized approaches (classical and multiple analyte injections) determined with an in-house software.

		$k_a (\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$		$k_d (\times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$	
	Case study	Optimized classical approach	Optimized multiple analyte injections	Optimized classical approach	Optimized multiple analyte injections
i	CBS/CAII at 18°C	2.75 ± 0.01 (5.14%)**	2.78 ± 0.01 (4.21%)	17.87 ± 0.04 (0.86%)	17.95 ± 0.04 (3.80%)
	Sulf*/CAII at 18°C	1.775 ± 0.008 (7.61%)	1.84 ± 0.01 (11.48%)	68.7 ± 0.3 (5.90%)	54.2 ± 0.3 (16.47%)
ii	BDS/CAII at 12°C	7.28 ± 0.02 (3.36%)	5.75 ± 0.02 (15.02%)	40.9 ± 0.1 (3.08%)	50.3 ± 0.2 (16.18%)
	Sulf*/CAII at 12°C	1.334 ± 0.005 (7.74%)	1.126 ± 0.005 (8.89%)	34.4 ± 0.1 (2.53%)	30.8 ± 0.1 (12.75%)
ii	CBS/CAII at 12°C	2.23 ± 0.01 (8.75%)	2.088 ± 0.008 (1.85%)	8.76 ± 0.02 (3.17%)	8.93 ± 0.04 (5.22%)
i	Sulf*/CAII at 12°C	see above	1.308 ± 0.002 (5.64%)	see above	30.5 ± 0.1 (14.31%)
i	CBS/ CAII at 12°C	see above	2.10 ± 0.01 (2.46%)	see above	9.20 ± 0.03 (8.32%)
V	BDS/ CAII at 12°C	see above	7.988 ± 0.02 (1.67%)	see above	50.1 ± 0.2 (14.86%)

*Sulf: Sulfanilamide

**Deviation from classical method

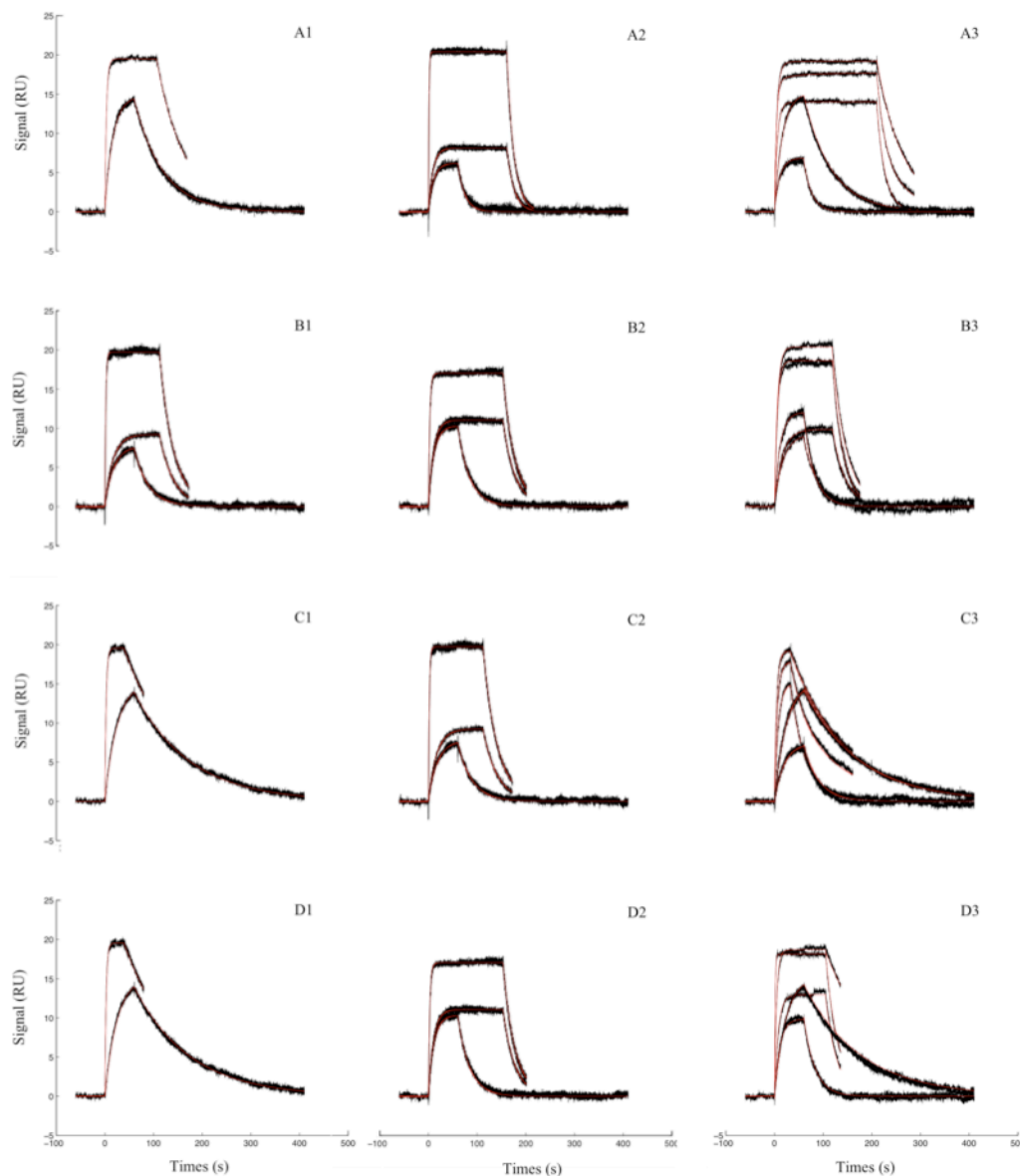


Figure 3.2. Optimized classical experiments and optimized multiple analyte injections for kinetic analysis of CBS, BDS and sulfanilamide binding to CAII surfaces using a BIACORE T100 biosensor.

Black dots correspond to control-corrected and double referenced sensorgrams for all case studies. Red lines correspond to the global fits with a 1:1 interaction model for classical method and model (2) for multiple analyte injections. Case studies i and iii: Panels A1/C1, A2/C2 and A3/C3 correspond to the injections of CBS, sulfanilamide and CBS-sulfanilamide, respectively, at 18°C/12°C. Case study ii: Panels B1, B2 and B3 correspond to the injections of sulfanilamide, BDS and sulfanilamide-BDS, respectively, at 12°C. Case study iv: Panels D1, D2 and D3 correspond to the injections of CBS, BDS and CBS-BDS, respectively, at 12°C. The injections were performed on the 4308-RU CAII surface, except for case study iv which was performed on the 4533-RU CAII surface. Note that panels B1, C1 and B2 correspond to the same kinetic experiments as panels C2, D1 and D2, respectively.

Optimized multiple analyte injections

The online optimization strategy was applied as follows: duplicate injections of buffer and analytes (at concentrations of (1.59 μ M, 1.51 μ M), (1.59 μ M, 0.63 μ M) and (1.51 μ M, 0.63 μ M) for the respective (CBS, sulfanilamide), (CBS, BDS) and (sulfanilamide, BDS) couples) were performed. The buffer injections were used for double referencing. Kinetic parameters were computed from the generated sensorgrams and were used to solve the optimization problem (3.8). As for the classical optimized experiments, the solution must respect the constraints on confidence, experimental time and material consumption. For all case studies, three optimized injections were needed to get a solution for the optimization problem (Figure 3.2). Once the optimized injections performed, the kinetic parameters were computed by globally fitting the sensorgrams (non-optimized and optimized). The results are summarized in Table 3.3. The longest optimal injections were observed for the case studies i and ii, where the kinetics of association (and dissociation for case 2) were similar. In these cases, the experiments were longer because the discrimination between R_{max} and each kinetic of association needed more time as reported by De Crescenzo *et al.*, 2008b. Moreover, extra time was necessary to discriminate between the kinetics of association. The shortest optimal experiments were observed in case iii and iv, where the kinetic parameters of association (and dissociation for case 4) were different. This is due to easier discrimination between kinetics of association on one hand, and kinetics of association and R_{max} on the other hand.

The first observation related to time reduction is that, even without any optimization, a reduction of almost 20 % for experiment duration was achieved by multiple analyte injections. The time of the experiments between the first two columns of Table 3 is reduced from 328 min to 264 min (1.24 ratio).

Table 3.3. Experimental times and material consumptions.

Case Study	Classical approach		Multiple analyte injections		Optimized classical approach		Optimized multiple analyte injections	
	Time (min)	Material consumption*	Time (minutes)	Material consumption	Time (min)	Material consumption	Time (min)	Material consumption
BS, Sulf/CAII at 18°C	328	20.66	264 (1.24)**	32.17 (0.64)***	140.8 (2.33)	15.17 (1.36)	113.3 (2.89)	8.67 (2.38)
DBS, Sulf/CA I at 12°C	328	12.67	264 (1.24)	18.83 (0.67)	166.1 (1.97)	9.17 (1.38)	125.62 (2.61)	3.02 (4.19)
CBS, Sulf/CAII at 12°C	328	20.66	264 (1.24)	32.17 (0.64)	124.3 (2.64)	9.17 (2.25)	89.1 (3.68)	1.83 (11.29)
CBS, DBS/CAII at 12°C	328	12.67	264 (1.24)	19.67 (0.64)	127.6 (2.57)	2.67 (4.75)	84.7 (3.87)	3.98 (3.18)

* Material consumption is expressed in nmoles;

** Values in bracket correspond to time ratio (i.e. time value for classical experiments divided by the corresponding value for a given strategy). Note that computing time was not taken into account in these calculations, as it was, in most cases negligible (close to a minute).

*** Values in bracket correspond to material consumption ratio (i.e. Material consumption for classical experiments divided by the corresponding value for a given strategy).

By optimizing the experiments, experimental time was further reduced. As reported in Table 3.3, time consumption was drastically reduced for optimized single analyte experiments, in good agreement with De Crescenzo *et al.* (2008b). Indeed optimized single analyte experiments are 2.17 to 2.9 times faster than their classical counterparts. Of special interest, the approach based on optimized multiple analyte injection further reduced the experimental time: this experimental approach is 2.61 to 3.89 times faster than classical experiments.

3.2.5 Conclusion

Surface plasmon resonance has become an efficient tool to characterize the interactions between macromolecules in bioscience. This technology gives enough information to make the identification of kinetic parameters possible and reliable, when users follow rigorous experimental protocols aiming at minimizing experimental artefacts (such as mass transfer limitation and surface heterogeneity). By following these experiment protocols and combining them with an efficient data analysis approach, kinetic parameters can be derived with good confidence. The problem of this classical approach resides in the experimental time. On that note, it has been shown by (Ö'neil and Andersson 2005)) and later by De Crescenzo *et al.* (2008b) that SPR experiments can be much faster when the injections are carefully chosen.

In this manuscript, in an effort to further reduce the experimental time of SPR-based experiments, different experimental approaches were tested and compared on their ability to provide a good estimation of kinetic parameters: classical experiments, optimized single analyte experiments, multiple analyte injections and optimized multiple analyte injections. It is here demonstrated that, for small molecular weight compounds, simultaneously injecting multiple analytes coupled to an optimization algorithm can improve the throughput of the SPR biosensors. The approach was not however tested for mass-transfer limited interactions. The latter may indeed create additional challenges related to the inherent complexity of the kinetic models describing these interactions; this point is currently under investigation in our laboratory.

3.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

GDC is a Canada Research Chairholder (CRC on Protein-enhanced Biomaterials, tier 2 level). This research was supported by FQRNT (GDC) and NSERC grants.

3.2.7 REFERENCES

- Cannon MJ, Papalia GA, Navratilova I, Fisher RJ, Roberts LR, Worthy KM, Stephen AG, Marchesini GR, Collins EJ, Casper D and others. 2004. Comparative analyses of a small molecule/enzyme interaction by multiple users of Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **330**(1):98-113.
- Danielson UH. 2009. Integrating surface plasmon resonance biosensor-based interaction kinetic analyses into the lead discovery and optimization process. *Future Med Chem* **1**(8):1399-414.
- Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszka DG. 2002. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Science* **11**(5):1017-1025.
- De Crescenzo G, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M. 2008a. Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors : principle and emerging trends. *Cellular and Molecular Bioengineering* **1**(4):204-215.
- De Crescenzo G, Woodward L, Srinivasan B. 2008b. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *Journal of Molecular Recognition* **21**(4):256-266.
- Gorshkova II, Svitel J, Razjouyan F, Schuck P. 2008. Bayesian Analysis of Heterogeneity in the Distribution of Binding Properties of Immobilized Surface Sites. *Langmuir* **24**(20):11577-11586.
- Karlsson R, Katsamba PS, Nordin H, Pol E, Myszka DG. 2006. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Analytical Biochemistry* **349**(1):136-147.

- Myszka DG. 2004. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology. *Analytical Biochemistry* **329**(2):316-323.
- Myszka DG. 1999. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* **12**(5):279-84.
- Myszka DG, Morton TA. 1998. CLAMP©: a biosensor kinetic data analysis program. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(4):149-150.
- Navratilova I, Papalia GA, Rich RL, Bedinger D, Brophy S, Condon B, Deng T, Emerick AW, Guan H-W, Hayden T and others. 2007. Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **364**(1):67-77.
- O'Connor-McCourt MD, De Crescenzo G, Lortie R, Lenferink A, Grothe S. 1998. The analysis of surface plasmon resonance-based biosensor data using numerical integration: the epidermal growth factor receptor-ligand interaction as an example. In: Lundahl P, Lundqvist A, Greiger E, editors. *Quantitative Analysis of Biospecific Interactions*: Harwood academic publishers. p 178-190.
- Ö'neil A, Andersson K. 2005. Kinetic determinations of molecular interactions using Biacore-- minimum data requirements for efficient experimental design. *Journal of Molecular Recognition* **18**(4):307-317.
- Papalia GA, Baer M, Luehrsen K, Nordin H, Flynn P, Myszka DG. 2006. High-resolution characterization of antibody fragment/antigen interactions using Biacore T100. *Analytical Biochemistry* **359**(1):112-119.
- Rich RL, Myszka DG. 2007. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Analytical Biochemistry* **361**(1):1-6.

Rich RL, Myszka DG. 2010. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008:

'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* **23**(1):1-64.

Tanious FA, Nguyen B, Wilson WD. 2008. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Methods Cell Biol* **84**:53-77.

CHAPITRE 4 SURFACE PLASMON RESONANCE SIGNAL IS NOT PROPORTIONAL TO MASS FOR SMALL MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS

4.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé " **Surface Plasmon Resonance Signal is not Proportional to Mass for Small Molecular Weight Compounds** ". L'article a été soumis au journal *Analytical Biochemistry* en janvier 2013. Lors de la modélisation des interactions entre un ligand versus deux analytes, nous avons observé une déviation de 17 % sur les constantes cinétiques. Bien qu'acceptable, cette déviation est supérieure aux déviations de 10 % observées en répétant les expériences classiques. Le modèle construit est basé sur l'hypothèse de proportionnalité entre l'accumulation de la masse et du signal SPR, donc le signal de la SPR à la saturation doit être proportionnel au poids moléculaire de l'analyte. Dans cette étude, nous avons démontré que cette hypothèse n'est pas correcte dans le cas des composés de faible poids moléculaire. Partant de cette observation, nous avons corrigé le modèle pour les interactions entre un ligand versus plusieurs analytes. Les constantes cinétiques identifiées ont une déviation inférieure à 10 %, ce qui rejoint l'expérimentation classique.

4.2 Surface Plasmon Resonance Signal is not Proportional to Mass for Small Molecular Weight Compounds

AUTHORS: Massinissa Si Mehand, Bala Srinivasan* and Gregory De Crescenzo*

SUBJECT CATEGORY: *Physical Techniques*

Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal. P.O. Box 6079, Centre-ville Station, H3C 3A7 Montréal, Québec, Canada

* Both authors equally contributed to this work. To whom all correspondence should be sent.

BS: Tel: (514)-340-4711 x7472, Fax: (514)-340-2990 E-mail address:
bala.srinivasan@polymtl.ca

GDC: Canada Research Chair in Protein-enhanced Biomaterials.

Tel: (514)-340-4711 x7428, Fax: (514)-340-2990. E-mail address:
gregory.decrescenzo@polymtl.ca

RUNNING TITLE: Multiple Analyte Injection Modelling

4.2.1 ABSTRACT

Surface plasmon resonance-based biosensors have been successfully applied to the study of the interactions between macromolecules and small molecular weight compounds. Several approaches have been developed to increase the throughput of these SPR-based experiments. Among them, we recently proposed to combine a numerical optimization approach with the injection of multiple analytes [Mehand MS, J Mol Recognit, 2012, 25(4), 208-15]. In our previous study, we assumed that there was proportionality between the signal and the molecular weight of the analytes. In this paper, we show that this assumption does not always hold true for small molecular weight compounds. We thus propose here a new model that takes into account this discrepancy when analyzing data emanating from multiple-analyte injections.

KEYWORDS: Multiple analyte injections; surface plasmon resonance; biosensor; kinetics.

4.2.2 INTRODUCTION

Within the last decades, Surface Plasmon Resonance (SPR)-based biosensors have evolved to become an almost indispensable tool for the rigorous investigation of the interactions occurring between biomolecules (De Crescenzo *et al.*, 2008a; Rich and Myszka 2010). The applications of these biosensors to different fields such as biochemistry, environmental protection, biotechnology, medical diagnostics, drug screening, food safety and security has already been acknowledged (Guo 2012). Their ever-growing popularity may be due to their high sensitivity, their high degree of automation as well as the availability of robust data analysis software packages (Gorshkova *et al.*, 2008; Mehand *et al.*, 2012; Myszka and Morton 1998).

In order to satisfy the throughput capacity required for drug screening campaigns, most of the latest SPR-based biosensor developments have been directed to provide researchers with tools combining the flexibility and information-rich measurements of SPR devices to the high-throughput capacity of standard *in vitro* assays such as ELISA (Hoa *et al.*, 2007). In this endeavour, SPR biosensing platforms being able to inject one sample against hundreds of immobilized targets, or multiple samples on multiple surfaces are now available. However, in most cases, the throughput capacity of these platforms is detrimental to the confidence level one can get on the kinetic parameters: classical low throughput SPR instruments still remain the most appropriate tools for precise kinetic parameter determination. A classical experiment with these instruments consists of 5-to-10 analyte injections. Of interest, it has been demonstrated that two injections, when adequately chosen, allow for kinetic parameter determination with similar confidence as that of resulting from classical experiments (Ö'nell and Andersson 2005). With that in mind, our group has already developed an iterative optimisation algorithm aiming to reduce experimental time and material consumption under the desired confidence on kinetic parameters

(De Crescenzo *et al.*, 2008b). Recently, we went one step further by introducing an experimentation strategy based on simultaneous injections of two analytes combined with numerical optimization (Mehand *et al.*, 2012). We demonstrated that this method further improves the throughput of the SPR while reducing material consumption for small molecules. In this approach, the interactions between analytes and a given ligand have been modelled by assuming that the amplitude of the signal corresponding to each analyte was proportional to the mass accumulation on the surface and indirectly to the molecular weight, as already assumed by others (Biacore 2006a; Lung *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2006).

Experimentally, this multiple analyte injection strategy was reported to lead to deviations lower than 17.11 % when kinetic parameters were compared to those determined with a classical method. Although acceptable, such a deviation is higher than that reported for independent duplicates, i.e. less than 10 % (Navratilova *et al.*, 2007). In this paper, we demonstrate that this discrepancy in the deviation values is due to the fact that the proportionality assumption we mentioned above may not hold true for small molecular weight compounds. To overcome this issue, a new model allowing for multiple analyte injections while reducing the deviation on kinetic parameters to less than 10 % has been developed and validated.

4.2.3 MATERIALS AND METHODS

Materials

Experimental data sets were generated with a BIACORE T100 optical biosensor equipped with research-grade CM5 sensor chips (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC). HBS-EP buffer, acetate buffer and ethanolamine were purchased from GE Healthcare. N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), carbonic anhydrase isozyme II (CAII) that had been purified from bovine erythrocytes, 4-carboxybenzenesulfonamide (CBS), sulfanilamide, 1,3-benzenedisulfonamide (BDS), Sulpiride, Furosemide, 5-dimethyl-amino-1-naphthalene-sulfonamide (DNSA), Acetazolamide, dimethyl sulfoxide (DMSO) and phosphate buffer saline (PBS, 10 mM, pH 7.4) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON).

Biosensor surface preparation

Biosensor surface preparation (CAII and blank surfaces) were performed according to published protocols (Navratilova *et al.*, 2007). CAII surface was prepared at density of approximately 5000 RU. After CAII immobilization or blank surface generation, the system was extensively primed with running buffer (HBS-EP).

BIACORE sample injections

Analyte and buffer preparations

Analytes and buffer were prepared according to protocol reported in Navratilova *et al.* 2007. HBS-EP with 3% of DMSO was used as a running buffer. All the analytes were dissolved in pure DMSO ([CBS] =1.76 mM, [BDS]=0.35 mM, [sulphanilamide]= 1.67 mM, [Sulpiride]=

9.19 mM, [Furosemide]= 8.4205 mM, [DNSA]=1.97 mM and [Acetazolamide]=9.19 mM). These stocks were diluted by mixing 30 μ l with 970 μ l of pure HPS-EP, resulting in concentrations of 52.98 μ M, 10.49 μ M, 50.27 μ M, 275.81 μ M, 252.61 μ M, 59.10 μ M and 275.81 μ M for each analyte, respectively with 3% of DMSO in order to match the amount of DMSO in the running buffer.

Single analyte injections

Prior to analyte injections, 3 prime procedures and buffer injections were performed to stabilize the baseline of the instrument. All injections were performed in duplicate at a flow rate of 100 μ l/min with a data collection rate set at 10 Hz, at 18 °C. For preliminary classical kinetic experiments, CBS, BDS, sulphanilamide, sulpiride and furosemide samples were injected at concentrations comprised between 264.90 nM and 52.98 μ M, 52.45 nM and 10.49 nM, 251.37 nM and 50.27 μ M, 1.37 μ M and 275.81 μ M or 315.80 nM and 252.61 μ M respectively, in addition to 6 buffer solutions (for double referencing purpose), for 60 s across both control and CAII surfaces, followed by a maximum of 350 s injection of HBS-EP running buffer at 18 °C. As complete dissociation was observed in each case, no regeneration procedure was performed, in agreement with previous reports (Day *et al.*, 2002; Navratilova *et al.*, 2007).

Multiple analyte injections

Analytes were combined at different temperatures to create 11 case studies (including the case studies reported in (Mehand *et al.*, 2012)) as shown in Table 4.1. For each case study, 13 couples of concentrations were chosen to cover the dimension space for concentrations.

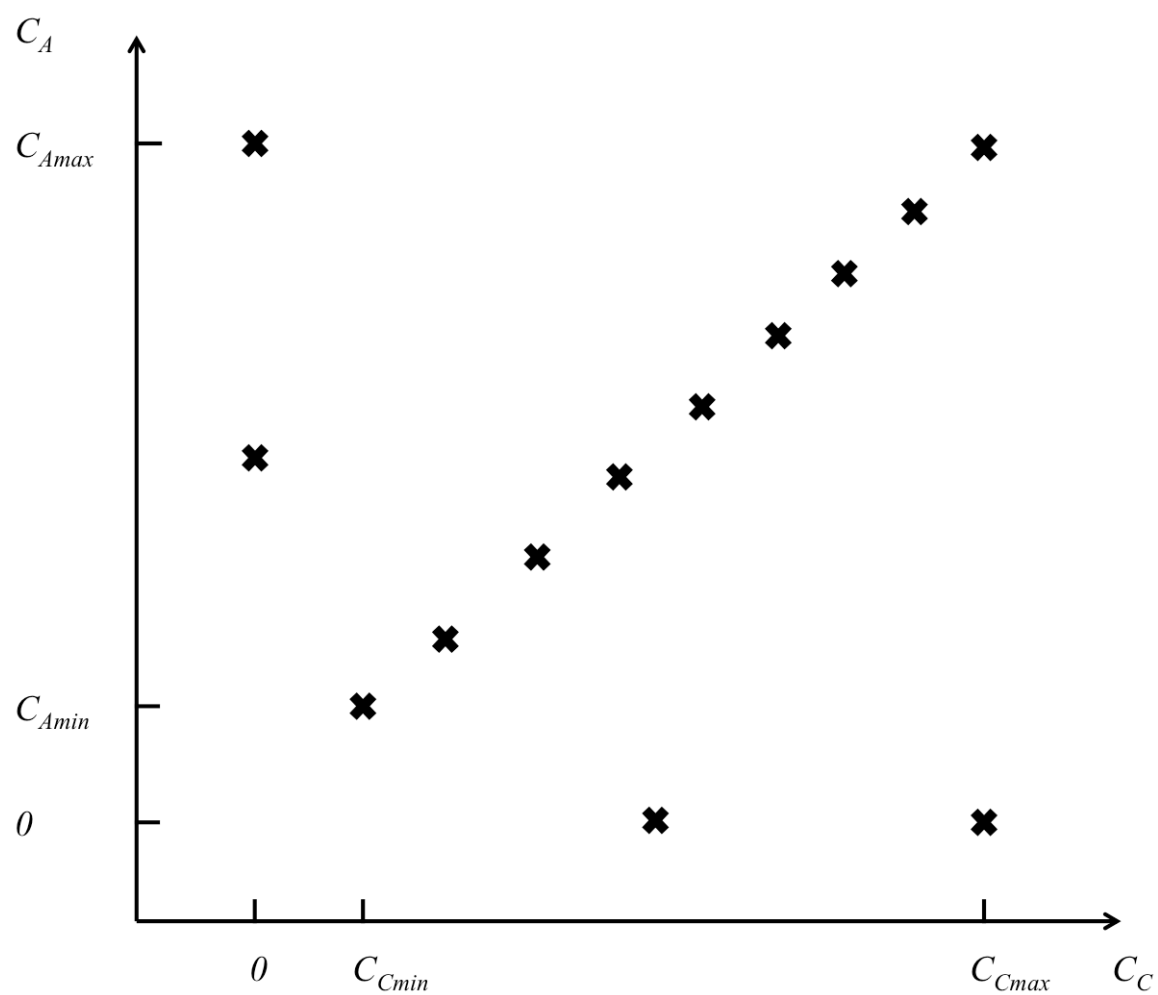


Figure 4.1. Experimental strategy for multiple analyte injection experiments.

Data analysis

In the case of classical injections (single-analyte injections), data sets were analyzed with Biacore T100 evaluation software, Biaevaluation 1.1.1, for kinetic parameter determination. For multiple analyte injections and optimized experiment analysis, in-house software packages were developed with the MATLAB 7.7.0.471 (R2008b) software platform (The Mathworks, Natick, USA). Those include the software package already described in the manuscript of Mehand et al. (2012) as well as the new multiple analyte injection model which will be presented in detail in the subsequent sections. The kinetic model of Mehand *et al.* (2012) was applied either with local parameters R_i that had been originally added to take into account bulk effects, or without them. The optimization was solved with the standard simplex program available in the optimization Toolbox 4.1 of Matlab.

As advised by Mehand et al. 2012, in the case of multiple analyte injections, for fast and sure convergence, the sensorgrams corresponding to the injection of single analytes at their highest concentrations ($(C_{Amax}, 0)$ and $(0, C_{Cmax})$) were fitted first with a simple Langmuirian model. The resulting parameter values were taken as a starting point to fit all the data.

4.2.4 RESULTS AND DISCUSSION

Signal-to-molecular weight study

In order to verify the correlation between the molecular weight of a given analyte and the amplitude of the SPR signal resulting from its interaction with its immobilized biological partner, we immobilized the carbonic anhydrase isozyme II (CAII) at the surface of our SPR biosensor. CAII was selected since its interactions with many small molecular weight compounds have already been extensively characterized. Among known and well-characterized CAII binders,

CBS, BDS, DNSA, sulphanilamide, sulpiride, furosemide and acetazolamine were selected to cover a broad range of molecular weight (from 172 to 341.43 g/mol). Each compound, known to interact according to a 1:1 stoichiometry with CAII, was injected at a concentration allowing to reach saturation at 18 °C, i.e., [CBS] = 52.98 μ M, [BDS] = 10.49 μ M, [sulphanilamide] = 50.27 μ M, [Sulpiride] = 75.81 μ M, [Furosemide] = 252.61 μ M, [DNSA] = 59.10 μ M and [Acetazolamide] = 275.81 (Cannon *et al.*, 2004a; Day *et al.*, 2002; Myszka 2004; Navratilova *et al.*, 2007). The plateau value of the resulting double-referenced sensorgrams corresponding to surface saturation was then plotted against their molecular weight. As can be seen in Figure 4.2, there is no linear correlation between the molecular weight and the SPR signal for these small molecular compounds. For example, CBS and acetazolamide displayed saturation signals lower than sulphanilamide although sulphanilamide molecular weight is 14.51 % and 22.60 % lower than those of CBS and acetazolamide, respectively. The same observation can be made for furosemide that gave a saturation level being lower than those of sulpiride and DNSA, in spite of their higher molecular weights. These experiments thus clearly outlined that one cannot precisely predict the amplitude of the SPR signal resulting from surface saturation by a given analyte (R_{max}) from the molecular weight of the latter. Since we originally used molecular weights as weighting coefficients in our multiple-analyte injection model (Mehand *et al.*, 2012), we believe that we introduced an error in sensorgram interpretation, in turn ending up on biased kinetic constants.

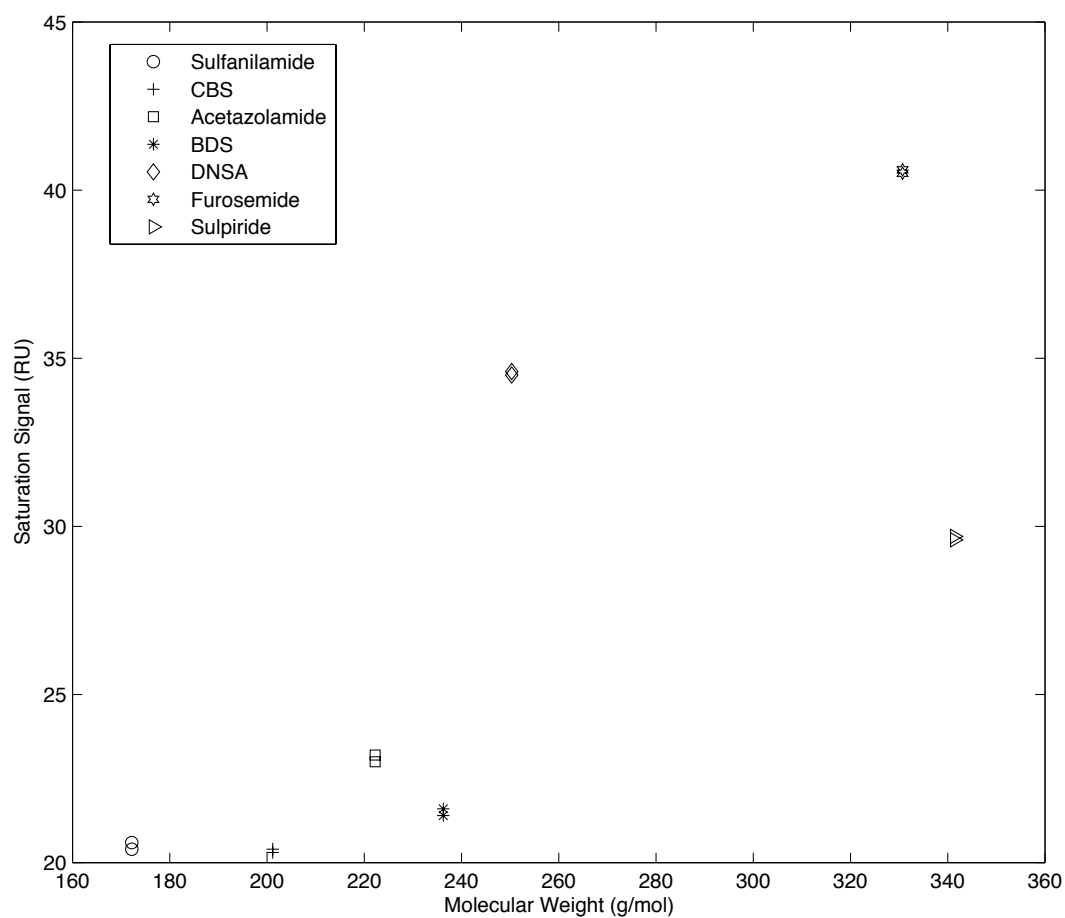
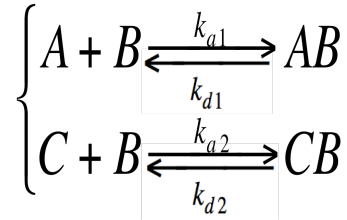


Figure 4.2. Observed saturation values as a function of drug molecular weight.

Based on this observation, we thus proposed a new model aiming to analyze sensorgrams resulting from multiple analyte injections. In this model, the ratio of the saturation levels of each analyte is estimated (α , global parameter) rather than calculated from the analyte molecular weights. This model is described in the *Theory* section below.

Theory

In this study, two analytes named A and C, were injected at known concentrations over a surface where their binding partner, the ligand B, had been previously immobilized. This results in the formation of two non-covalent complexes AB and CB. Assuming that the interactions are Langmuirian and there is no interaction between A and B, the following scheme describes what occurs at the biosensor surface:



where k_{a1} and k_{a2} are the related association rate constants expressed in $M^{-1}s^{-1}$, k_{d1} and k_{d2} are the dissociation rate constants of the interactions expressed in s^{-1} . The interactions are followed by monitoring the change of refractive index (in RU), due to resulting products AB and CB. Assuming that each ligand interacts with one analyte only and that no interaction occurs between the analytes, the following set of equations can thus be derived, using simple mass balances:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC_{AB}}{dt} = k_{a1}C_A(C_{B0} - C_{AB} - C_{CB}) - k_{d1}C_{AB}, \quad C_{AB}(0) = 0 \\ \frac{dC_{CB}}{dt} = k_{a2}C_C(C_{B0} - C_{AB} - C_{CB}) - k_{d2}C_{CB}, \quad C_{CB}(0) = 0 \end{array} \right. \quad (4.1)$$

where C_A , C_C correspond to the concentrations of free analyte A and C, C_{B0} is the concentration of the ligand B at the beginning of the interaction, C_{AB} and C_{CB} are the concentration of the complexes AB and CB respectively (in M).

$$C_{AB} = \delta R_1, \quad C_{CB} = \beta R_2, \quad C_{B_0} = \delta R_{\max 1} \text{ or } C_{B_0} = \beta R_{\max 2}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dR_1}{dt} = k_{a1} C_A (R_{\max 1} - R_1 - \frac{\beta}{\delta} R_2) - k_{d1} R_1 \\ \frac{dR_2}{dt} = k_{a2} C_C (\frac{\delta}{\beta} R_{\max 1} - \frac{\delta}{\beta} R_1 - R_2) - k_{d2} R_2 \\ R_T = R_1 + R_2 \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{dR_1}{dt} = k_{a1} C_A (R_{\max 1} - R_1 - \alpha R_2) - k_{d1} R_1 \\ \frac{dR_2}{dt} = k_{a2} C_C (\frac{1}{\alpha} R_{\max 1} - \frac{1}{\alpha} R_1 - R_2) - k_{d2} R_2 \\ R_T = R_1 + R_2 \end{array} \right. \quad (4.2)$$

$$C_{B_0} = \delta R_{\max 1} = \beta R_{\max 2} \Rightarrow \alpha = \frac{\beta}{\delta} = \frac{R_{\max 1}}{R_{\max 2}}$$

Where δ and β are proportionality constants related to analytes A and C respectively.

Parameter identification problem

In order to identify the parameters k_{a1} , k_{a2} , k_{d1} and k_{d2} , a series of experiments with varying concentrations of analytes A and C were performed. Each experiment consists of an on-period (analyte injection) t_a and an off-period (buffer injection) t_d . From the experimental data, the following least squared identification algorithm is used to compute the required parameters:

$$\min_{k_{a1} k_{a2} k_{d1} k_{d2} R_{\max} \alpha} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{P_i} (R_{meas}^i(j) - R_{pred}^i(j))^2 \quad (4.3)$$

where N is the number of sensorgrams, P_i the number of data points in sensorgram i , R_{meas} the measurements, and R_{pred} the prediction from the model presented above. k_{a1} , k_{a2} , k_{d1} , k_{d2} , R_{\max} , and α are defined as global parameters.

Model validation

Injectons of various analyte pairs, i.e., (CBS, sulpiride), (CBS, furosemide), (BDS, sulpiride), (BDS, furosemide), (sulphanilamide, sulpiride), (sulphanilamide, furosemide) and (sulpiride, furosemide) were performed at 18°C according to the experimental plan described in Figure 4.1. Injection time was fixed at 60 s and the maximum dissociation time was 350 s. Each data set was control-corrected, double-referenced and used for parameter fitting. We also included in our analysis data we previously generated and published (Mehand *et al.*, 2012). Those correspond to (CBS,sulphanilamide) injections at 18°C, (BDS,Sulfanilamide), (CBS,Sulfanilamide) and (CBS,BDS) injections at 12°C (sensorgrams not shown in this manuscript). Three distinct models are used:

- i) model #1: α is chosen to $\alpha = \frac{M_1}{M_2}$ and no local parameter R_i is used
- ii) model #2: $\alpha = \frac{M_1}{M_2}$ – with local parameter R_i ;
- iii) model #3 : α is a free parameter – no local parameter R_i .

The three models were chosen as the first corresponded to the current generalized assumption. However, since the fit was poor, though R_i did not have a mechanistic justification, it could be used to improve the fit. The third model removes the assumption that the signal is proportional to analyte molecular weight. Fits corresponding to the model # 3 are presented in Figure 4.3.

The deviations of the kinetic parameters determined with each model, from those determined using a classical single analyte injection strategy, are presented in Table 4.1. We

observed the highest deviation of the kinetic parameters when applying model #1 - These deviations reached more than 54% for several drug combinations and were correlated with bad fits as judged by visual inspection of the residual plots (difference between calculated and experimental data points; data not shown). The use of local parameters (model #2) improved both fits and accuracy on kinetic parameters up to 27%, although, as now understood, the use of R_i had no mechanistic justification. Of salient interest, the maximal deviation decreased to 9% when model #3 was used to analyze the data.

The fits related to the use of model #3 were judged excellent (Figure 4.3 and data not shown) and model #3 was able to adequately describe the complexity of several sets of sensorgrams displaying humps during the injection phase (Panels A, B and D of Figure 4.3). These humps occur when the analyte displaying the highest R_{max} value has faster kinetic rates than those of the other analyte. Of salient interest, for each data set, it is possible to calculate an experimental α value. The latter corresponds to the ratio of the plateau values (R_{max}) corresponding to single analyte injections that were performed at C_{max} , since these concentrations were known to correspond to saturation (see Figure 4.1 for the experimental strategy). As can be seen in Table 4.1, these experimental values are in very good agreement with the values of α that were obtained from the global fit of the various sets of sensorgrams.

Table 4.1. Kinetic parameter deviation related to the use of the different models.

Experiment*	Individual compound	Model #1	Model #2	Model #3	α	R _{max} ratio
CBS/Sulfanilamide (18°C)	CBS	17.3% / 7.6%	0.3% / 4.2%	5.1% / 0.03%	0.89	0.89
	Sulfanilamide	19.6% / 15.2%	9.7% / 2.3%	1.2% / 1.5%		
BDS/Sulfanilamide (12°C)	BDS	34.8% / 19.2%	13.4% / 11.8%	0.1% / 2.4%	0.95	0.95
	Sulfanilamide	54.3% / 13.6%	17.1% / 1.1%	5.7% / 1.6%		
CBS/Sulfanilamide (12°C)	CBS	11.0% / 1.3%	1.8% / 3.9%	2.9% / 0.6%	1.07	1.07
	Sulfanilamide	9.0% / 29.5%	2.5% / 9.8%	1.7% / 7.8%		
CBS/BDS (12°C)	CBS	17.0% / 4.3%	10.0% / 1.7%	5.5% / 3.8%	1.02	1.03
	BDS	19.6% / 8.6%	1.3% / 2.7%	1.1% / 2.0%		
CBS/Sulpiride (18°C)	CBS	19.3% / 0.8%	18.4% / 0.2%	5.9% / 0.3%	0.59	0.61
	Sulpiride	49.3% / 5.1%	18.3% / 4.3%	0.6% / 5.2%		
BDS/Sulpiride (18°C)	CBS	18.5% / 2.0%	21.1% / 2.6%	5.5% / 5.1%	0.51	0.53
	Sulpiride	40.0% / 2.9%	26.6% / 6.6%	3.5% / 6.8%		
Sulfanilamide/Sulpiride (18°C)	Sulfanilamide	13.9% / 6.1%	6.1% / 6.8%	8.1% / 8.0%	0.50	0.51
	Sulpiride	6.0% / 4.1%	7.2% / 3.5%	9.4% / 6.7%		
CBS/Furosemide (18°C)	CBS	21.8% / 12.7%	11.0% / 13.7%	5.0% / 9.5%	0.52	0.51
	Furosemide	1.7% / 8.5%	1.6% / 6.7%	4.3% / 9.6%		
BDS/Furosemide (18°C)	BDS	49.5% / 4.0%	23.8% / 10.1%	6.1% / 6.2%	0.54	0.55
	Furosemide	5.0% / 10.6%	5.0% / 9.5%	6.9% / 8.9%		
Sulfanilamide/Furosemide (18°C)	Sulfanilamide	43.1% / 14.6%	23.6% / 15.2%	8.9% / 5.9%	0.57	0.58
	Furosemide	12.4% / 9.4%	16.9% / 9.1%	9.7% / 9.2%		
Sulpiride/Furosemide (18°C)	Sulpiride	28.2% / 8.0%	20.6% / 7.7%	0.3% / 2.7%	1.14	1.13
	Furosemide	2.6% / 2.9%	5.2% / 2.8%	4.1% / 3.1%		

* For each scenario, deviations of the kinetic parameters (k_d/k_d) from those determined using a classical single analyte injection approach, are given. α and R_{max} ratio are defined in the text.

Discussion

In this study, it has been shown that, in the case of analytes corresponding to small molecular weight, the amplitude of the SPR is not proportional to the analyte molecular weight. While such a deviation from expected values does not affect the determination of the kinetic parameters when performing classical experiments (i.e., injections of a single analyte at various concentrations over a given surface), this unreported behaviour causes significant deviations in the case of multiple analyte injections. Although the cause of such an absence of proportionality has not been determined, the introduction of a global parameter (α) corresponding to the ratio of the R_{max} values of the different analytes solved the issues of biased kinetic parameters.

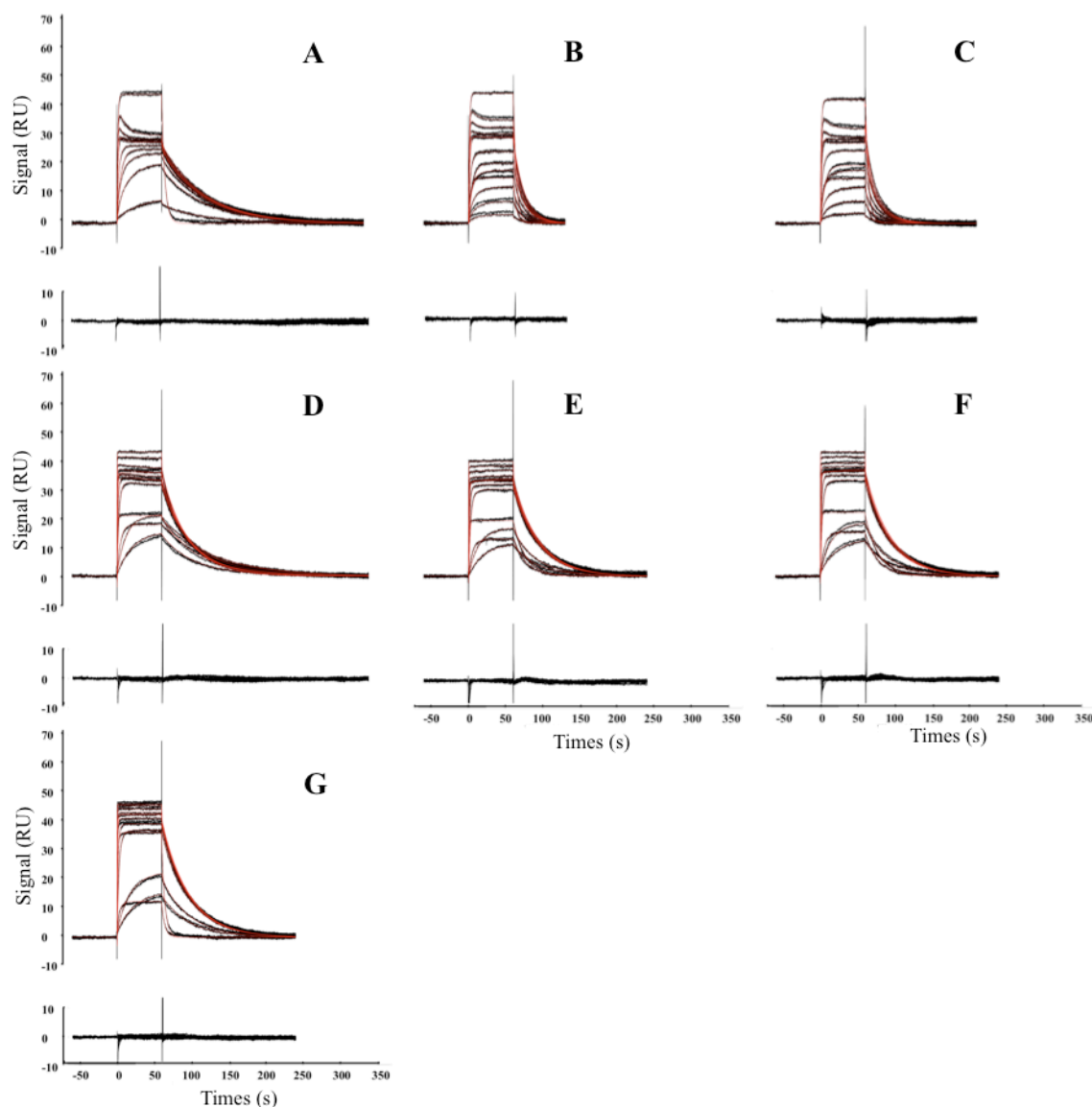


Figure 4.3. Kinetic analysis of multiple analyte injection experiments.

Black dots correspond to control-corrected and double referenced sensorgrams for all case studies. Red lines correspond to global fits using model # 3. A, B, C, D, E, F and G correspond to the injection of the following analyte pairs: CBS-Sulpiride, BDS-Sulpiride, Sulphanilamide-Sulpiride, CBS-Furosemide, BDS-Furosemide, Sulphanilamide-Furosemide and Sulpiride-Furosemide at 18 °C over CA II (5000 RU). The concentrations of CBS, BDS, Sulphanilamide, Sulpiride and Furosemide were varied from 264 nM to 52.981 μ M, 52 nM to 10.494 μ M, 251 nM to 50.274 μ M, 1.37 μ M to 275.81 μ M and 0.31 to 252.61 μ M, respectively, according to the experimental strategy described in Figure 4.1. For all sensorgram data set, related residual plot is given below.

We previously introduced the concept of multiple analyte injections as a way to increase the throughput of SPR biosensor devices. In that endeavour, the approach was combined to an online optimization algorithm to limit the duration and the number of multiple analyte injections (Mehand *et al.*, 2012). With this method, the experimental time and material consumption were shown to be drastically reduced. Beside the experimental work reported in this manuscript, the addition of the α parameter in the kinetic model describing multiple-analyte injections was also tested with our on-line optimization approach; our results indicated that the throughput and the overall performances of the method were not affected.

4.2.5 Conclusion

The kinetic model available in the Biaevaluation software package has been applied to analyze sensorgrams corresponding to analyte heterogeneity (Lung *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2006). In this model it is hypothesized that the part of signal corresponding to a given analyte is proportional to its molecular weights. It is shown here that this assumption does not hold true for small molecular weight compounds, in turn leading to biases in kinetic parameter values. For small molecular weight compounds, model # 3 described in this manuscript is more relevant.

4.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

GDC is a Canada Research Chairholder (CRC on Protein-enhanced Biomaterials, tier 2 level). This research was also supported by FQRNT (GDC) and NSERC grants (GDC, BS).

4.2.7 Reference

Biacore. 2006. Biacore T100 Software Handbook. Biacore: Uppsala.

Cannon MJ, Papalia GA, Navratilova I, Fisher RJ, Roberts LR, Worthy KM, Stephen AG, Marchesini GR, Collins EJ, Casper D and others. 2004. Comparative analyses of a small molecule/enzyme interaction by multiple users of Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **330**(1):98-113.

Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszka DG. 2002. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Science* **11**(5):1017-1025.

De Crescenzo G, Woodward L, Srinivasan B. 2008a. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *Journal of Molecular Recognition* **21**(4):256-266.

De Crescenzo G, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M. 2008b. Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors : principle and emerging trends. *Cellular and Molecular Bioengineering* **1**(4):204-215.

Gorshkova II, Svitel J, Razjouyan F, Schuck P. 2008. Bayesian Analysis of Heterogeneity in the Distribution of Binding Properties of Immobilized Surface Sites. *Langmuir* **24**(20):11577-11586.

Guo X. 2012. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *J Biophotonics*.

Hoa XD, Kirk AG, Tabrizian M. 2007. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens Bioelectron* **23**(2):151-60.

- Mehand MS, De Crescenzo G, Srinivasan B. 2012. Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections. *J Mol Recognit* **25**(4):208-15.
- Myszka DG, Morton TA. 1998. CLAMP©: a biosensor kinetic data analysis program. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(4):149-150.
- Myszka DG. 2004. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology. *Analytical Biochemistry* **329**(2):316-323.
- Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri Y, Taguch T, Suzuki T, Sekino T, Mimori K, Ebata T, Saito M, Nakao H and others. 2001. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by Surface Plasmon Resonance. *J Biol Chem* **276**(46):42915-22.
- Navratilova I, Papalia GA, Rich RL, Bedinger D, Brophy S, Condon B, Deng T, Emerick AW, Guan H-W, Hayden T and others. 2007. Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **364**(1):67-77.
- Ö'neil A, Andersson K. 2005. Kinetic determinations of molecular interactions using Biacore--minimum data requirements for efficient experimental design. *Journal of Molecular Recognition* **18**(4):307-317.
- Park HR, Mockrell LM, Du Y, Kasinsji A, Havel J, Zhao J, Reyes-Turcu F, Wilkinson KD, Fu H. 2008. Protein-Protein Interactions. In: Walker JM, Rapley R, editors. *Molecular Biomethods Handbook*. Springer ed: Humana Press. p 463-492.
- Pearson J, Hill J, Swank J, Isoherranen N, Kunze K, Atkins W. 2006. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with Kinetic Resolution of Multiple Binding Orientations. *Biochemistry* **45**(20):6341-53.

Rich RL, Myszka DG. 2010. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* **23**(1):1-64.

CHAPITRE 5 OPTIMISATION DE LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE AVEC DISCRIMINATION DE MODÈLE

5.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé " **On-line Kinetic Model Discrimination for Optimized Surface Plasmon Resonance Experiments** " qui a été soumis pour publication dans la revue « *Journal of molecular recognition* » le mois de février 2013. Cet article se penche sur la problématique de la limitation par transfert de masse et son incorporation dans les algorithmes d'optimisation développés dans notre laboratoire. Ce chapitre présente une méthode qui évite la détermination de constantes cinétiques biaisées tout en minimisant la collecte de données inutiles. Les résultats démontrent que cette méthode ne rallonge pas de façon significative le temps d'expérience lorsque comparé à l'algorithme d'optimisation initial basé sur un modèle cinétique simple uniquement.

5.2 On-line Kinetic Model Discrimination for Optimized Surface Plasmon Resonance Experiments

AUTHORS

Massinissa Si Mehand, Gregory De Crescenzo* and Bala Srinivasan*

Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal. P.O. Box 6079, Centre-ville Station, H3C 3A7 Montréal, Québec, Canada

* Both authors equally contributed to this work. To whom all correspondence should be sent.

BS: Tel: (514)-340-4711 x7472, Fax: (514)-340-2990 E-mail address:
bala.srinivasan@polymtl.ca

GDC: Canada Research Chair in Protein-enhanced Biomaterials.

Tel: (514)-340-4711 x7428, Fax: (514)-340-2990. E-mail address:
gregory.decrescenzo@polymtl.ca

5.2.1 ABSTRACT

In order to improve the throughput of Surface Plasmon Resonance (SPR)-based biosensors, an on-line iterative optimization algorithm has been presented aiming at reducing experimental time and material consumption without any loss of confidence on kinetic parameters [De Crescenzo (2008) *J. Mol Recognit.*, 21, 256-66.]. This algorithm was based on a simple Langmuirian model to compute the confidence and predict optimal injections. However, this kinetic model is not suitable for all interactions, as it does not include mass transfer limitation that may occur for fast interaction kinetics. If a simple model was to be used when this phenomenon influenced the interactions, kinetic parameters would be biased. On the other hand, we show in this paper that data analysis with a kinetic model including a mass transfer limitation step would lead to longer experiments and poorer confidence if the interactions were simple. So, in this manuscript, we present an on-line model discrimination and optimization approach to increase the throughput of SPR biosensors.

KEYWORDS: model discrimination, surface plasmon resonance; biosensor; kinetics, mass transfer limitations.

5.2.2 INTRODUCTION

Over the last two decades, Surface Plasmon Resonance (SPR)-based biosensors have gained in popularity and become one of the most useful tools for real-time and label-free bimolecular interaction analysis (De Crescenzo *et al.*, 2008a; Geschwindner *et al.*, 2012; Holdgate *et al.*, 2010; Rich and Myszka 2010). The rapid emergence of the SPR technology has lead to the commercialization of several automated instrument platforms (Rich and Myszka 2007; Scarano *et al.*, 2010) with improved detection sensitivity (Abbas *et al.*, 2011; Papalia *et al.*, 2006) and to the development of optimized experimental protocols and data analysis software packages (De Crescenzo *et al.*, 2008b; Gorshkova *et al.*, 2008; Mehand *et al.*, 2012; Myszka and Morton 1998; O'Connor-McCourt *et al.*, 1998). These developments have strengthened the robustness and reliability of the SPR instruments (Geschwindner *et al.*, 2012). Most of the SPR biosensors now allow for real-time measurements, thus permitting kinetic parameter identification, an asset in the drug discovery process (Holdgate and Gill 2011; Ladbury *et al.*, 2010; Swinney 2009). SPR-based biosensing is now acknowledged as a method of choice for primary screening in drug discovery (Navratilova and Hopkins 2011), thanks to the development of a new generation of instruments allowing for the injection of one analyte over hundreds of targets (Rich and Myszka 2007). But the quality of the kinetic parameters determined from data analysis collected with these platforms is poor when compared to that of classical low-throughput instruments.

Experiments with low-throughput systems involve the generation of 5 to 10 sensorgrams by varying the concentration of the injected molecule within a range of concentrations that had been determined by the experimenter *a priori*. This experimental approach may generate more data than actually needed. Indeed, Ö'nell and Andersson (2005) showed that two adequately chosen injections are enough for the identification of kinetic parameters with the same level of

confidence as from a classical set of injections. It is thus possible to drastically reduce experimentation duration and thus increase throughput; the key issue in that endeavor is to choose these two injections adequately. We have solved this problem by introducing a new on-line strategy (De Crescenzo *et al.*, 2008b) to determine the optimal experiment to be performed (optimal injection duration and analyte concentration) by taking into account kinetic profile that had been already collected. This algorithm is based on one non-optimized injection; the collected data are used for a first estimation of the parameters. These parameters are used to solve an optimization problem that predicts an injection to be performed to increase the level of confidence on the kinetic parameters. The level of confidence is set equal to the confidence level of a corresponding classical SPR experiment. Our results indicated that when a simple model depicted the interaction, one or two carefully planned injections were sufficient to get comparable confidence on kinetic parameters as when deduced from the analysis of classical experiments (De Crescenzo *et al.*, 2008b). We originally based our approach on simple kinetics; the use of a simple model is however not relevant when mass transfer limitation influences the kinetics of interaction (Goldstein *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 1999). In this case, a simple model will not fit experimental data and the identified kinetic parameters will be biased.

In this manuscript, we demonstrate that on the other hand, the use of a two-compartment model describing mass transfer limitation (MTL) (Myszka *et al.*, 1998) cannot be combined to our on-line algorithm since, when the interaction is simple, it will lead to longer experiments and it may potentially result in decreased confidence levels on kinetic parameters. We investigated the domain of application of each model based on the conclusions of Goldstein and colleagues, (1999). Based on these conclusion and the work of De Crescenzo *et al.*, 2008b, we designed an algorithm to improve the throughput of the SPR experiments while selecting the adequate model

to depict the interactions. This algorithm was shown to be almost as fast as the optimization strategy we originally proposed without any model discrimination.

Theory

Modeling of the interaction

After the immobilization of one of the interacting species (the ligand, later denoted B) at the biosensor surface, standard Biacore experiments (the most widely used SPR biosensors now sold by GE Healthcare) consist of injecting its binding partner (the analyte A), followed by the injection of a buffer solution to monitor the dissociation of the ligand/analyte complexes. If the dissociation is not complete, an additional regeneration step must be included in the protocol. All these steps (complex formation, dissociation and regeneration) constitute a sensorgram. A set of sensorgrams can be obtained by repeating these steps while varying the length of the analyte/buffer injections or the analyte concentration.

When MTL does not influence the interaction the following simple model describes the interactions:

$$\dot{R} = k_a C_T (R_{\max} - R) - k_d R \quad (5.1)$$

where k_a and k_d are the related association and dissociation rate constants expressed in $M^{-1}s^{-1}$ and s^{-1} . R is the resulting recorded signal in RU, corresponding to the surface accumulation of A resulting from complex formation (AB). R_{\max} is the maximal amount of analyte that can specifically bind to the surface in RU. C_T is the concentration of injected analyte.

For molecular systems displaying fast kinetic rates, the interactions may be influenced by MTL; the following model describes them:

$$\begin{cases} \dot{\tilde{C}}_A = -k_a C_A (\tilde{R}_{\max} - \tilde{R}) + k_d \tilde{R} + \tilde{k}_M (C_T - C_A) \\ \dot{\tilde{R}} = k_a C_A (\tilde{R}_{\max} - \tilde{R}) - k_d \tilde{R} \end{cases} \quad (5.2)$$

$$\tilde{R} = \frac{R}{h}, \quad \tilde{R}_{\max} = \frac{R_{\max}}{h}, \quad \tilde{k}_M = \frac{k_M}{h}$$

where k_M corresponds to the mass transfer coefficient (cm/s) and C_A is the concentration of the analyte at the vicinity of the surface where the interaction takes place (in M). In the case of the MTL model, note that Goldstein and colleagues (1999) demonstrated that the value of h did not influence the kinetic parameters and the data were insensitive as well; h was thus set to 1 RU/M for simplicity sake. C_T is the concentration of injected analyte

Parameter identification problem

To identify k_a and k_d , sensorgrams are generated by varying the concentration of the analyte A. Each sensorgram consists of an on-period (analyte injection, t_a) and an off-period (buffer injection, t_d). From the experimental data, the following least squares identification algorithm is used to compute the required parameters:

$$\min_{\lambda} \sum_{i=1}^N \frac{1}{P_i} \sum_{j=1}^{P_i} (R_{meas}^i(j) - R_{pred}^i(j))^2 \quad (5.3)$$

where λ is the parameter vector; $\lambda = [k_a \ k_d \ R_{\max}]$ for the simple model and $\lambda = [k_a \ k_d \ R_{\max} \ k_M]$ for the MTL model. N is the number of sensorgrams, P_i is the number of data points in the i^{th} sensorgram, R_{meas} is the value of a given data point, R_{pred} its related value predicted from the model presented in equation (5.1) or (5.2).

Confidence and standard error

Confidence in the identified parameters is an important indicator of the accuracy of the identification procedure. Confidence is a function of three factors: the noise, the number of measurements, and the experimental planning. The most common way of expressing the

confidence ε_j in parameter j , in this domain, is the standard error (De Crescenzo *et al.*, 2008b; Ö'nell and Andersson 2005):

$$\varepsilon_j = \rho \alpha \sqrt{(H^{-1})_{jj}} \quad (5.4)$$

where ρ is a proportionality constant based on the F -student distribution, the number of points used and the level of confidence that is sought, σ , the standard deviation of the measurement noise a_{jj} , the j^{th} diagonal element of the inverse of the Hessian matrix H . The Hessian matrix is given by:

$$H = \sum_{i=1}^N \frac{1}{P_i} \sum_{j=1}^{P_i} \left(\frac{\partial R_{pred}^i(j)}{\partial \lambda} \right)^T \left(\frac{\partial R_{pred}^i(j)}{\partial \lambda} \right) \quad (5.5)$$

The H matrix can be approximated by the square of the first order sensitivities assuming small deviations and linearity around the optimal point.

Calculation of the Hessian

To compute the standard error, it is necessary to know the Hessian. To calculate the H matrix, the following differential equations must be solved along with the mathematical model that describes the interactions:

$$\begin{aligned} x &= (R, C_A) \\ \frac{dx}{dt} &= f(x, \lambda) \\ \frac{d}{dt} \frac{dx}{d\lambda} &= \frac{\partial f}{\partial x} \frac{\partial x}{\partial \lambda} + \frac{\partial f}{\partial \lambda} \\ x(0) &= 0, \frac{dx}{d\lambda} = 0 \end{aligned} \quad (5.6)$$

where f represents the differential equations related to a given kinetic model.

Optimization and Model Discrimination

The optimization algorithm proposed by De Crescenzo *et al.* (2008b) is based on the satisfaction of the confidence level on two parameters of the simple model (kinetic constants). As already discussed, this model does not describe the interactions that are mass transfer limited. If such is the case, the simple model will return biased kinetic parameters. The MTL model is more appropriate to avoid this error. However, this model comprises an additional parameter. Hence, if the MTL model is used while analyte diffusion is not limiting (i.e., if data may be adequately fit with the simple model), the confidence on kinetic parameters will be decreased when compared to that determined using the simple model since the number of parameters influences negatively the confidence. As the experimental time of the optimized protocol originally proposed by De Crescenzo and colleagues (2008b) depends on the level of confidence, the choice of the model to depict the data is thus important. The direct replacement of the simple model by the MTL model is not an optimal solution, as demonstrated later. The introduction of model discrimination within the optimization algorithm is thus essential to avoid biased kinetic parameters (by always using the simple model) and unnecessary data collection (by always using the MTL model).

In this work, the optimization approach proposed by De Crescenzo *et al.* (2008b) is extended to find a compromise between model discrimination and optimization. Several criteria have been proposed in the literature to find the optimal design for model discrimination (Abd El-Monsef and Seyam 2011; Alberton *et al.*, 2011; Atkinson 2008; Schwaab *et al.*, 2008). Here model discrimination is not an end; rather, it is just a means to shorten the experiment. To do so, we used the dimensionless number below:

$$\theta = \frac{R_{\max} k_a}{k_M} = \frac{\tilde{R}_{\max} k_a}{\tilde{k}_M} \quad (5.7)$$

Of interest, if θ is low (i.e., $\theta < 0.1$) MTL is negligible and both simple and MTL models are equivalent; the use of a simple model is thus sufficient to analyze the experimental data. On the contrary, for θ values higher than 0.1, MTL significantly affect the kinetics of binding even when the fit with simple model gives good residuals. The latter occurs for $0.1 < \theta < 1$. In that case, as shown by Goldstein *et al.* (1999), $k_a^e = \frac{k_a}{1+\theta}$ and $k_d^e = \frac{k_d}{1+\theta}$. Thus for $\theta > 0.1$, the use of the MTL model is compulsory in order to get error on kinetic parameters of less than 10 %.

The discrimination step consists of raising the confidence on θ in order to choose the relevant model. To compute the confidence on θ , the following equation was used:

$$\frac{\Delta\theta}{\theta} = \sqrt{\left(\frac{\Delta\epsilon_{k_a}}{k_a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\epsilon_{R_{max}}}{R_{max}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\epsilon_{k_m}}{k_m}\right)^2} \quad (5.8)$$

$\Delta\epsilon_{k_a}$, $\Delta\epsilon_{R_{max}}$ and $\Delta\epsilon_{k_m}$ correspond respectively to the standard error of the parameters k_a , R_{max} and k_d . The equation (5.8) was obtained after linearization of the equation (5.7) and by assuming that there are no correlations between the parameters.

We could then define $(\theta_{min}, \theta_{max}) = \theta \pm \Delta\theta$.

Our optimization algorithm is presented in Figure 5.1. The objective of this algorithm is to minimize the length of the experiments while choosing the model that describes the interaction in order to avoid unnecessary data collection and biased kinetic parameter. To optimize the experiment and discriminate between the models, values of the parameters of the models have to be known. However, such is not the case experimentally: to evaluate these parameters our optimization algorithm is based on a first non-optimized experiment. Once the parameters are computed, the following problem is solved to predict the injection that will discriminate between the models:

$$\begin{aligned}
& \min_{t_a, t_d, C_A} (t_a + t_d) \\
& \text{s.t.} \left\{ \begin{array}{l} \xi_a \leq \delta_a, \xi_b \leq \delta_b \\ \text{if } \theta < 0.1 \text{ then } \theta_{\max} < 0.1 \\ \text{if } \theta > 0.1 \text{ then } \theta_{\min} > 0.05 \\ t_a + t_d < T_{\max}, \quad t_a < t_{a\max}, \quad t_d < t_{d\max}, \quad C_A < C_{\max} \end{array} \right. \quad (5.9)
\end{aligned}$$

where t_a and t_d are the duration of the association and the dissociation phase of the experiment, respectively; C_A is the concentration of analyte; $t_{a\max}$ and $t_{d\max}$ are the maximal durations allowed for the association and dissociation phases, respectively; $C_{A\max}$ is the maximal concentration of analyte allowed and T_{\max} the maximum total time allowed for the experiment. The standard errors ξ_a and ξ_d are computed based on the Hessian information. δ_a and δ_d are the constraints on kinetic parameters during the discrimination step. Note that this algorithm was designed as we observed that the confidence on θ was always very poor.

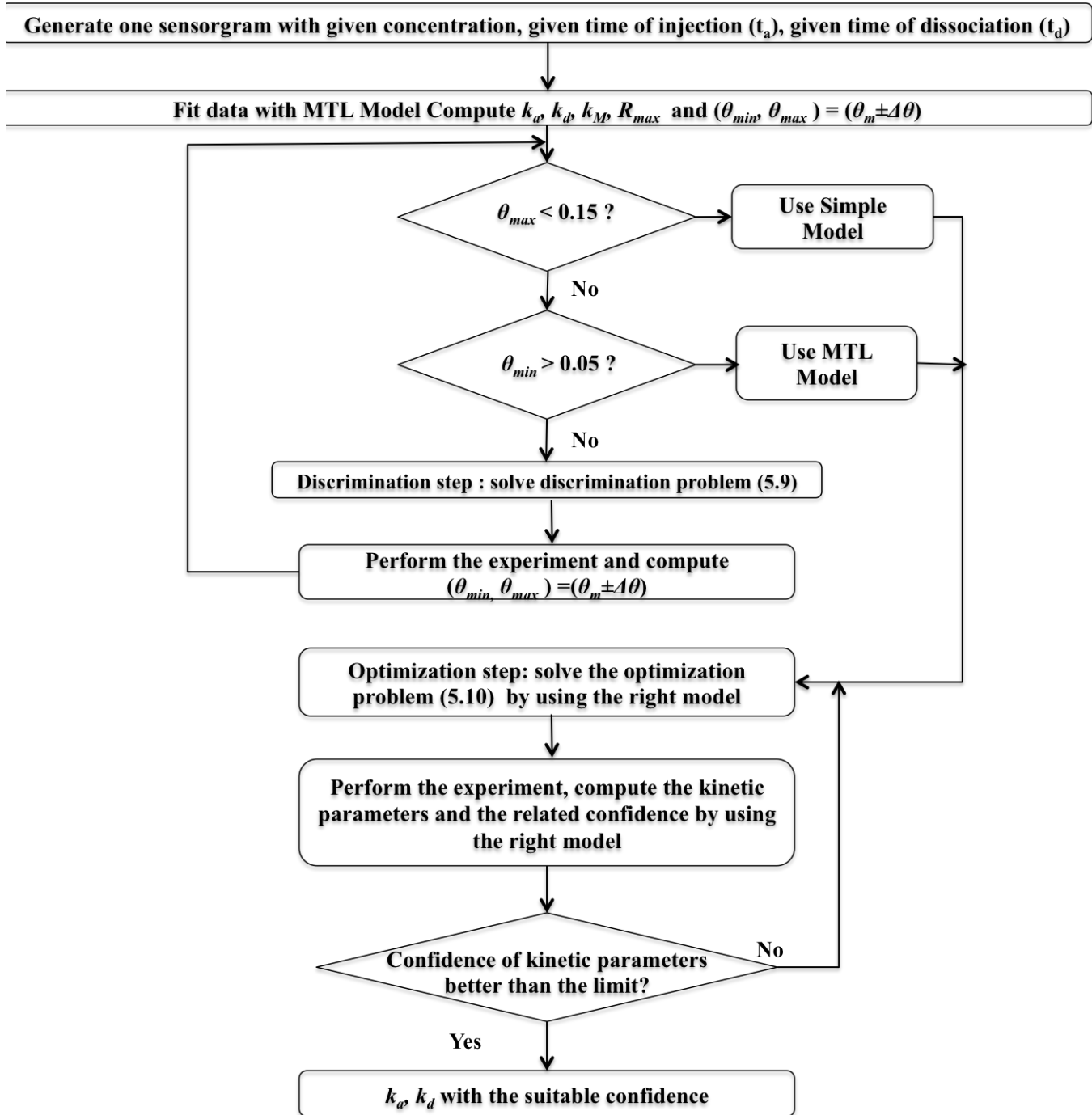


Figure 5.1. Algorithm corresponding to the 'optimization with model discrimination' approach.

The 'optimization with model discrimination' approaches

Once the model is chosen according to the algorithm presented in Figure 5.1, the optimization problem, expressed as follow, is used to optimize the experiment with the correct model to focus in the identification of the kinetic parameters with the desired level of confidence:

$$\begin{aligned} & \min_{t_a, t_d, C_A} (t_a + t_d) \\ \text{s.t. } & \begin{cases} \xi_a \leq \beta_a, \xi_b \leq \beta_b \\ t_a + t_d < T_{\max}, \quad t_a < t_{a\max}, \quad t_d < t_{d\max}, \quad C_A < C_{\max} \end{cases} \end{aligned} \quad (5.10)$$

where β_a and β_d are the desired standard errors on the estimated parameters k_a and k_d , respectively. Within this manuscript, the desired standard errors (β_a and β_d) were set equal to those we obtained from the analysis of the corresponding classical set of sensorgrams (see De Crescenzo et al., 2008b).

5.2.3 MATERIALS AND METHODS

Materials

Experimental data were generated with a BIACORE T100 optical biosensor equipped with research-grade CM5 sensor chips (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC). HBS-EP buffer, acetate buffer and ethanolamine were purchased from GE Healthcare. N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), carbonic anhydrase isozyme II (CAII) that had been purified from bovine erythrocytes, 4-carboxybenzenesulfonamide (CBS), sulfanilamide, 1,3-benzenedisulfonamide (BDS), acetazolamide, dimethyl sulfoxide (DMSO) and phosphate buffer saline (PBS, 10 mM, pH 7.4) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON).

Biosensor surface preparation

Biosensor surface preparation (CAII and blank surfaces) were performed according to published protocols (Navratilova *et al.*, 2007). CAII surfaces were prepared at a density of approximately 5000 RU. After CAII immobilization or blank surface generation, the system was extensively primed with buffer (HBS-EP).

Biacore sample injections

Analyte and buffer preparations

Analytes and buffer were prepared according to protocol reported in Navratilova *et al.* 2007. HBS-EP with 3% of DMSO was used as running buffer. All the analytes were dissolved in pure DMSO ([CBS] =1.76 mM, [BDS]=0.35 mM, [sulphanilamide]= 1.67 mM and [acetazolamide]=10,39 mM). These stocks were diluted by mixing 30 µl with 970 µl of pure HPS-EP, resulting in concentrations of 52.98 µM, 10.49 µM, 50.27 µM and 311.83 µM for each analyte, respectively with 3% of DMSO in order to match the amount of DMSO in the running buffer. 30 µl of the new solution of acetazolamide were mixed with 970 µl HPS-EP containing 3 % of DMSO to produce a new stock solution of 9.35 µM.

Analyte injections

Prior to analyte injections, 3 prime procedures and buffer injections were performed to stabilize the baseline of the instrument. All injections of CBS and sulphanilamide were performed in duplicate at a flow rate of 100 µl/min with a data collection rate set at 10 Hz, at 18°C. All injections of BDS and acetazolamide were performed in duplicate at a flow rate of 20 µl/min with a data collection rate set at 10 Hz, at 18°C. For preliminary classical kinetic experiments, CBS, sulphanilamide, BDS and acetazolamide were injected at concentrations comprised between 264.90 nM and 52.98 µM, 251.37 nM and 50.27 µM, 52.45 nM and 10.49 nM and 5.21 nM 9.35

μM respectively, in addition to 6 buffer solutions (for double referencing purposes), for 60 s across both control and CAII surfaces, followed by a maximum of 350 s injection of HBS-EP running buffer at 18°C . As complete dissociation was observed in each case, no regeneration procedure was performed, in agreement with previous reports (Day *et al.*, 2002; Navratilova *et al.*, 2007).

Data analysis

All simulations and data were analyzed with an in-house software package developed with the MATLAB 7.7.0.471 (R2008b) software platform (The Mathworks, Natick, USA). The least-squares problem presented in (5.2) was solved with the standard simplex program available in the optimization Toolbox 4.1 of Matlab. The optimization problems were solved by the sequential quadratic programming program available in the Toolbox 4.1 of Matlab.

5.2.4 RESULTS AND DISCUSSION

Direct optimization with MTL model

The optimization algorithm developed by De Crescenzo *et al.*, 2008b was originally based on a simple kinetic model that did not take into account any potential mass transfer limitation. As the MTL model (Myszka *et al.*, 1998) is more general, our first attempt consisted in replacing the simple model by the MTL model in our original algorithm.

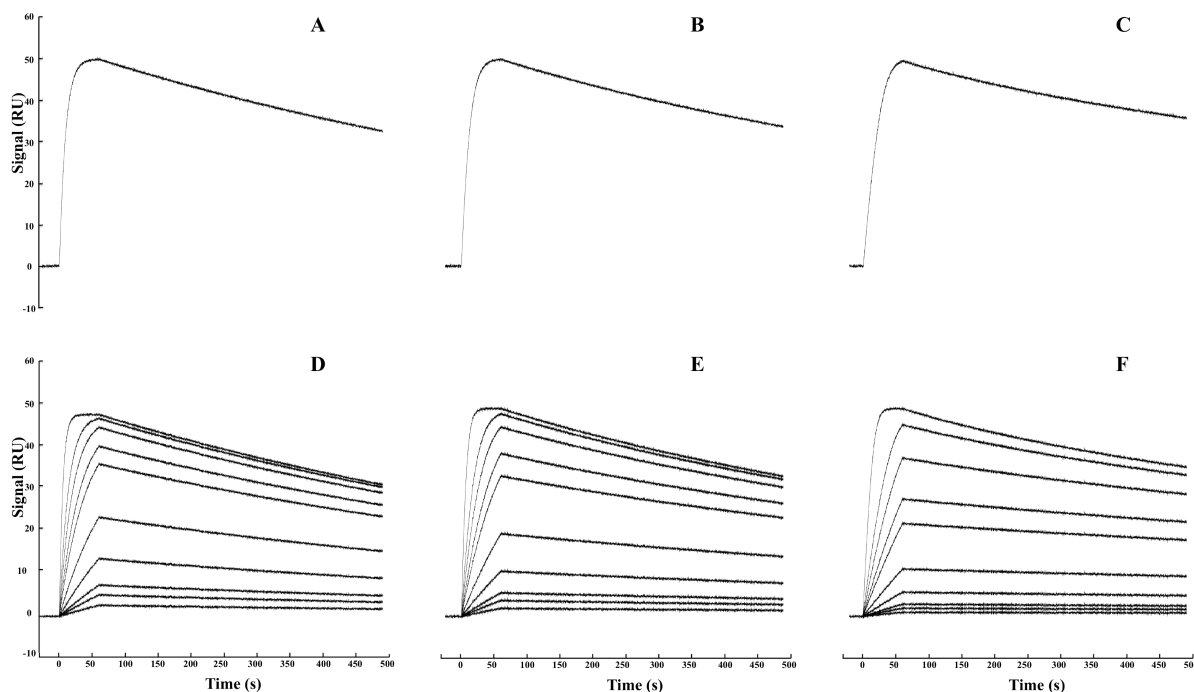


Figure 5.2. Simulated sensorgrams corresponding to the non-optimized data used in this manuscript.

Panels A, B and C correspond to the single sensorgrams that were simulated to test the direct replacement of the simple model by the MTL one in the original algorithm by De Crescenzo et al. (2008). Panels D, E and F correspond to the 'classical' sets of sensorgrams that were used as reference to determine the level of confidence on the kinetic parameters to be used as constraints by the different algorithms. All simulations were performed to cover the following three scenarios i) mass transfer limitation does not influence the interaction: $\theta = 0.05$, (panels A and D) ii) mass transfer limitation weakly influences the interaction: $\theta = 0.5$ (panels B and E) and mass transfer limitation strongly influences the interaction: $\theta = 2$ (panels C and F). In all cases k_a , k_d and R_{max} were set equal to $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 10^{-3}s^{-1} and 50 RU, respectively. The injection and dissociation times were set equal to 60 and 440 s, respectively.

Three scenarios were then simulated to test the validity of such an approach: i) mass transfer limitation does not influence the interaction ($\theta = 0.05$), ii) mass transfer limitation weakly influences the interaction ($\theta = 0.5$) and iii) mass transfer limitation strongly influences the interaction, ($\theta = 2$). In all cases, k_a , k_d and R_{max} values were fixed at $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 10^{-3}s^{-1} and 50 RU, respectively. The first non-optimized injections (from which our algorithm predicts which injection to be performed next) were simulated with an analyte concentration of $1.2 \text{ }\mu\text{M}$, t_d of 60 s and t_d of 440 s (Figure 5.2, panels A to C). For all simulations, a Gaussian noise with a standard deviation of 0.2 RU (corresponding to the background noise of the Biacore T100 instrument) was added (Figure 5.2). For each scenario, the constraints on confidence were computed by considering a set of sensorgrams corresponding to the classical method (i.e, simulation of 10 sensorgrams corresponding to concentrations varying from 10 nM to $2 \text{ }\mu\text{M}$ with a noise of 0.2 RU being added; Figure 5.2, panels D to F) as described in De Crescenzo *et al.*, 2008b. The model truly describing the interactions was then used to compute these constraints: simple model for $\theta = 0.05$ and MTL model for $\theta = 0.5$ and $\theta = 2$. Table 5.1 lists the duration of the various optimized injections that have been proposed by the modified optimization algorithm.

Table 5.1. Direct optimization with the MTL model

θ	Number of on-line optimized injections (s)	Duration of the on-line optimized injections (s)	Duration of the on-line optimized experiment *(s)	Duration of the classical experiment*
2	2	313	5504	11000
0.5	3	503	8025	11000
0.05	3	719	10190	11000

* In order to calculate the duration of the simulated experiments, the duration of the sensorgrams corresponding to analyte injections was doubled (duplicate injection) and the time corresponding to 4 buffer injections for calibration and double referencing purpose has been added (consistent with calculations reported in De Crescenzo *et al.*, 2008b).

As can be seen in Table 5.1, the shortest optimized experiment corresponded to the case where mass transfer strongly influenced the interaction ($\theta = 2$); whereas the longest optimized experiment was obtained when MTL did not influence the interaction ($\theta = 0.05$). Its duration was almost as long as a classical experiment (Table 5.1). This observation is directly related to the inappropriateness of the MTL model in this specific case, combined to the fact that the MTL model has an additional parameter when compared to the simple one (the more parameters a model has, the poorer the level of confidence is). Also, when simulated data corresponded to simple kinetics, the algorithm that used the MTL model was not able to propose optimized conditions to reach the desired confidence level (i.e., the level of confidence one would have had when analyzing the corresponding 'classical' set of sensorgrams). Altogether, this preliminary case study indicated that the direct replacement of the simple model used in the original algorithm of De Crescenzo et al., 2008 by the MTL model would lead to unnecessarily long experiments for all the cases where MTL does not influence the interaction. The extension of the original algorithm to interactions being potentially mass transfer limited must thus include a discrimination strategy so as to use the MTL model only when necessary.

To achieve this goal, two approaches combining optimization and model discrimination were proposed and tested with simulated data sets corresponding to the three scenarios we described earlier (Figure 5.2). These approaches are based on the algorithm presented in Figure 5.1. In both cases, the first proposed injection aims to discriminate between simple and MTL models, subsequent injection(s) aim(s) to refine parameter identification to reach the desired level of confidence on kinetic parameters (taking into account the information contained in the first two injections). Both approaches only differed on constraints imposed on kinetic parameters for the first injection. For approach 1, the algorithm presented in Figure 5.1 was first applied with the

constraints on kinetic parameters confidence being completely relaxed (i.e., $\delta_a = \delta_d = 100\%$) in an effort to predict the shortest injection that would allow to discriminate between the simple and MTL models, i.e., to give θ_{min} and θ_{max} values permitting discrimination (see Figure 5.1). Approach 1 was determined to be very efficient for model discrimination since the algorithm returned very short first injections (Table 5.2). However, as no significant improvement was made on the confidence on kinetic parameters with this injection, the subsequent optimized injections were longer or more than one optimized injections were required, eventually resulting in relatively long experimental time (Table 5.2).

As a trade-off between discrimination and confidence improvement, approach 2 was then designed. It corresponded to the case where the same algorithm is first applied with $\delta_a = \delta_d = 30\%$ in order to discriminate between models as well as gain on confidence on the kinetic parameters from the very first predicted injection. Thus, whereas in approach 1 the first proposed injection focused solely on discriminating between kinetic models, the first proposed injection within approach 2 aimed to increase confidence both on θ and kinetic parameters.

As can be seen in Table 5.2, approach 2 resulted in longer initial injections than those reported for approach 1. However, this slight increase allowed to reduce significantly the number and the duration of subsequent injections, resulting in global experimental durations of less than 40% of that of the corresponding classical experiment (4218 s versus 11000 s in the worst case, see Table 5.2). Based on these encouraging simulations, approach 2 was then experimentally tested.

Table 5.2. Simulations results related to approaches 1 and 2.

	θ	Number of injections*	Duration of the on-line optimized injections (s)**	Duration of the on-line optimized experiment (s) ***	Duration of classical experiment***
Approach 1 ($\delta_a=$ $\delta_d=100\%$)	2	1 + 3	60 + 296	6322	11000
	0.5	1 + 2	60 + 241	5288	11000
	0.05	1 + 1	73 + 120	4158	11000
Approach 2 ($\delta_a=$ $\delta_d=30\%$)	2	1 + 1	143 + 60	4218	11000
	0.5	1 + 1	70 + 60	3780	11000
	0.05	1 + 1	117 + 82	4194	11000

* The first number corresponds to the number of the injection for model discrimination and the second one to the subsequent injection(s) for experiment optimization

** The first number corresponds to the duration of the injection for model discrimination and the second one to the subsequent injection(s) for experiment optimization.

*** In order to calculate the duration of the simulated experiments, the duration of the sensorgrams corresponding to analyte injections was doubled (duplicate injection) and the time corresponding to 4 buffer injections for calibration and double referencing purpose has been added (consistent with calculations reported in De Crescenzo *et al*, 2008).

Experimental validation

Based on the literature (Cannon *et al.*, 2004a; Mehand *et al.*, 2012; Navratilova *et al.*, 2007), biological systems corresponding to carbonic anhydrase isozyme II (CAII) interactions with various drugs were selected to generate data corresponding to the three aforementioned scenarios. Kinetics corresponding to CAII interacting with CBS, sulfanilamide and BDS at 18°C with a flow rate of 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ have already been reported to follow a simple model (Navratilova

et al., 2007) whereas those corresponding to acetazolamide have been reported to include MTL when experiments were performed at 25°C (Cannon *et al.*, 2004). In order to explore various scenarios, CBS and sulfanilamide were injected at 100 µl/min whereas BDS and acetazolamide were injected at 20 µl/min to increase mass transfer limitation and thus cover the three scenarios we had simulated.

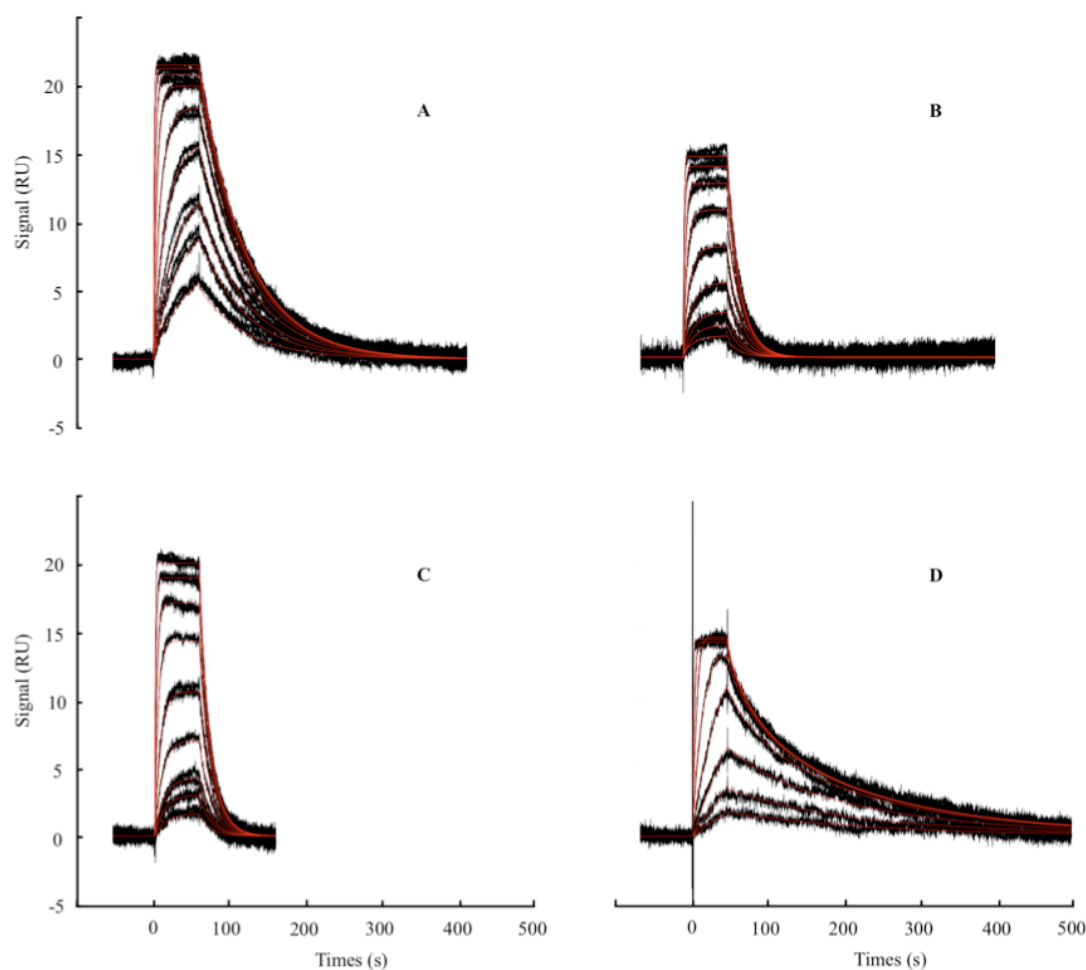


Figure 5.3. Classical kinetic analysis of CBS, Sulfanilamide, BDS and acetazolamide binding to CAII surfaces.

Black dots correspond to control-corrected and double referenced sensorgrams for all case studies. Panels A to D correspond to the injection of CBS, sulfanilamide, BDS and acetazolamide over CA II (5000 RU), respectively. Red lines correspond to global fits using the simple model for panels A and B and the MTL model for panels C and D.

Classical data generation and kinetic analysis were performed to compute kinetic parameters related to these interactions using both simple and MTL models. Global fits and related kinetic parameters are presented in Figure 5.3 and Table 5.3. As expected, experimental data covered all possible scenarios: no MTL for CBS and sulfanilamide (i.e., $\theta = 0.06$ and $\theta = 2.61 \cdot 10^{-5}$, respectively), limited MTL for BDS injected at low flow rate ($\theta = 0.28$) and strong MTL for acetazolamide (i.e., $\theta = 4.28$). For BDS (low MTL), differences in kinetic parameter values when using a simple model rather than the MTL model were of 15 % (although fits emanating from the use of the simple model were judged as good). This deviation increased to 74 % for acetazolamide; in this case, fits were not as perfect as visually determined (data not shown).

For experimental validation, approach 2 was applied as follows: quadruplicate injections of buffer and duplicate injections of analyte (non-optimized injections) were performed at analyte concentration of 3.17 μM , 3.01 μM , 0.62 μM and 22.50 nM for CBS, sulphanilamide, BDS and acetazolamide, respectively. Temperature, flow rate and duration of the injection were identical to those performed for the generation of the classical data sets (Figure 5.3). For each drug, double-referenced sensorgrams were then used as input in our in-house software package (Figure 5.1). Kinetic parameters, θ and their related confidence were computed with the MTL model. As a poor confidence was observed for each drug, a first optimized injection was proposed by our software in order to discriminate between kinetic models; this injection was then performed in duplicate. As for the non-optimized injection, quadruplicate buffer injections were also performed for double referencing purpose. Kinetic parameters, θ and their related confidence were computed from all sensorgrams (non-optimized and optimized). In all cases, this unique injection was sufficient to choose the correct model. Once the model was chosen, the problem of optimization (5.10) was solved to improve the confidence on the kinetic parameters. In all cases,

one injection was predicted by the software and was experimentally performed. Subsequent analysis confirmed that desired confidence levels on kinetic parameters had been reached. Experimental data corresponding to this on-line optimization approach are presented in Figure 5.4 and resulting kinetic parameters are summarized in Table 5.3. A comparison of these parameters with those emanating from classical experiments or from the literature (Mehand *et al.*, 2012; Navratilova *et al.*, 2007) indicated that our proposed approach was successful for kinetic parameter identification. Furthermore, approach 2 allowed noticeable reduction of experiment duration as indicated by the time reduction reported in the last column of Table 5.3 (this value corresponds to the ratio between the durations of optimized experiment and its related classical experiment). This ratio ranged between 2.15 to 3.09. Of salient interest, these values were found to be very similar to those we previously reported when performing on-line optimization without any model discrimination (De Crescenzo *et al.*, 2008b; ratio ranging from 1.8 to 3.2).

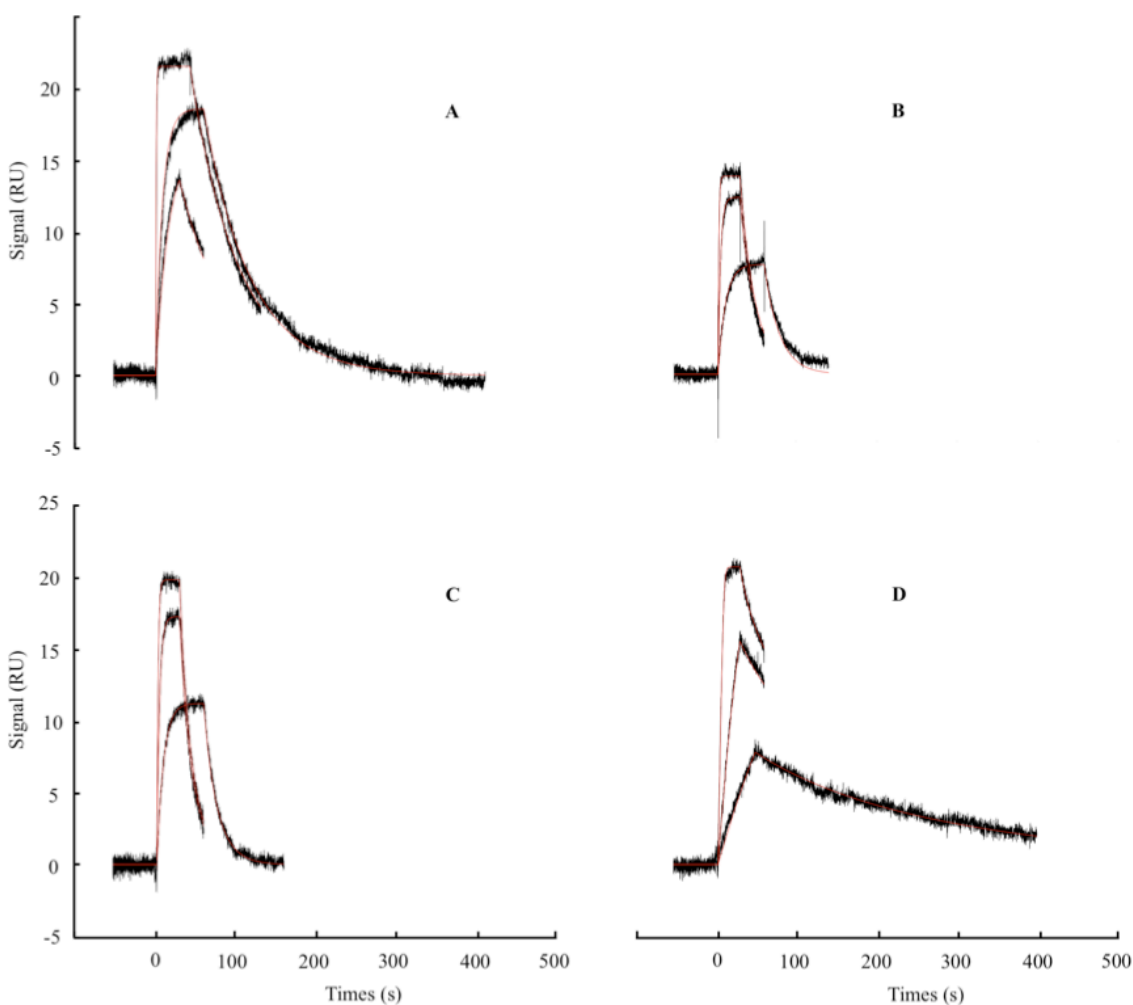


Figure 5.4. Experiments performed according to approach 2 for kinetic analysis of CBS, sulfanilamide, BDS and acetazolamide binding to CAII surfaces using a BIACORE T100 biosensor.

Black dots correspond to control-corrected and double referenced sensorgrams for all case studies. Red lines correspond to global fits using the simple model in A, B and model one in C, D. Panels A, B, C, D correspond to the injection of the following analytes: CBS, Sulfanilamide, BDS and Acetazolamide at 18 °C over CA II (5000 RU).

Table 5.3. Kinetic constants determined by the classical method and approach 2 (discrimination/optimization).

	Classical method		Approach 2		Time reduction ratio
	$k_a \times 10^4$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_d \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$k_a \times 10^4$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_d \times 10^{-3}$ (s^{-1})	
CBS 100 μ l/min	2.9 ± 0.3	16 ± 1	3.2 ± 0.3	17 ± 1	2.52
Sulfanilamide 100 μ l/min	2.0 ± 0.2	58 ± 4	2.2 ± 0.2	60 ± 4	2.15
BDS 20 μ l/min	12 ± 2	73 ± 10	12 ± 2	76 ± 8	2.85
Acetazolamide 20 μ l/min	238 ± 47	19 ± 4	282 ± 56	23 ± 3	3.09

Altogether, since our approach can be easily automated, data presented in this manuscript highly suggest that the algorithm we have developed may be valuable to increase the throughput of current biosensors when screening large compound libraries for kinetic characterization.

5.2.5 ACKNOWLEDGEMENTS

GDC is a Canada Research Chairholder (CRC on Protein-enhanced Biomaterials). This research was supported by FQRNT (GDC) and NSERC (BS, GDC) grants.

5.2.6 References

- Abbas A, Linman MJ, Cheng Q. 2011. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosens Bioelectron* **26**(5):1815-24.
- Abd El-Monsef MME, Seyam MM. 2011. CDT-optimum designs for model discrimination, parameter estimation and estimation of a parametric function. *Journal of Statistical Planning and Inference* **141**(2): 639–643.
- Alberton A, Schwaab M, Lobao MWN, Pinto J. 2011. Experimental design for the joint model discrimination and precise parameter estimation through information measures. *Chemical Engineering Science* **66**(9):1940–1952.
- Atkinson AC. 2008. Journal of Statistical Planning and Inference. *Journal of Statistical Planning and Inference* **138**(1):56–64.
- Cannon MJ, Papalia GA, Navratilova I, Fisher RJ, Roberts LR, Worthy KM, Stephen AG, Marchesini GR, Collins EJ, Casper D and others. 2004. Comparative analyses of a small molecule/enzyme interaction by multiple users of Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **330**(1):98-113.
- Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszka DG. 2002. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Science* **11**(5):1017-1025.
- De Crescenzo G, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M. 2008a. Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors : principle and emerging trends. *Cellular and Molecular Bioengineering* **1**(4):204-215.
- De Crescenzo G, Woodward L, Srinivasan B. 2008b. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *J Mol Recognit* **21**(4):256-266.
- Geschwindner S, Carlsson JF, Knecht W. 2012. Application of optical biosensors in small-molecule screening activities. *Sensors (Basel)* **12**(4):4311-23.

- Goldstein B, Coombs D, He X, Pineda AR, Wofsy C. 1999. The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore. *J Mol Recognit* **12**(5):293-9.
- Gorshkova II, Svitel J, Razjouyan F, Schuck P. 2008. Bayesian Analysis of Heterogeneity in the Distribution of Binding Properties of Immobilized Surface Sites. *Langmuir* **24**(20):11577-11586.
- Holdgate GA, Anderson M, Edfeldt F, Geschwindner S. 2010. Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: matching high information content with high throughput. *J Struct Biol* **172**(1):142-57.
- Holdgate GA, Gill AL. 2011. Kinetic efficiency: the missing metric for enhancing compound quality? *Drug Discov Today* **16**(21-22):910-3.
- Ladbury JE, Klebe G, Freire E. 2010. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat Rev Drug Discov* **9**(1):23-7.
- Mason T, Pineda AR, Wofsy C, Goldstein B. 1999. Effective rate models for the analysis of transport-dependent biosensor data. *Mathematical Biosciences* **159**(2):123-144.
- Mehand MS, De Crescenzo G, Srinivasan B. 2012. Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections. *J Mol Recognit* **25**(4):208-15.
- Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. 1998. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. *Biophysical Journal* **75**(2):583-594.
- Myszka DG, Morton TA. 1998. CLAMP©: a biosensor kinetic data analysis program. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(4):149-150.
- Navratilova I, Hopkins AL. 2011. Emerging role of surface plasmon resonance in fragment-based drug discovery. *Future Med Chem* **3**(14):1809-20.
- Navratilova I, Papalia GA, Rich RL, Bedinger D, Brophy S, Condon B, Deng T, Emerick AW, Guan H-W, Hayden T and others. 2007. Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **364**(1):67-77.

- O'Connor-McCourt MD, De Crescenzo G, Lortie R, Lenferink A, Grothe S. 1998. The analysis of surface plasmon resonance-based biosensor data using numerical integration: the epidermal growth factor receptor-ligand interaction as an example. In: Lundahl P, Lundqvist A, Greiger E, editors. *Quantitative Analysis of Biospecific Interactions*: Harwood academic publishers. p 178-190.
- Ö'nell A, Andersson K. 2005. Kinetic determinations of molecular interactions using Biacore--minimum data requirements for efficient experimental design. *J Mol Recognit* **18**(4):307-317.
- Papalia GA, Baer M, Luehrsen K, Nordin H, Flynn P, Myszka DG. 2006. High-resolution characterization of antibody fragment/antigen interactions using Biacore T100. *Analytical Biochemistry* **359**(1):112-119.
- Rich RL, Myszka DG. 2007. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Analytical Biochemistry* **361**(1):1-6.
- Rich RL, Myszka DG. 2010. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* **23**(1):1-64.
- Scarano S, Mascini M, Turner AP, Minunni M. 2010. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosens Bioelectron* **25**(5):957-66.
- Schwaab M, Luiz Monteiro J, Carlos Pinto J. 2008. Sequential experimental design for model discrimination: Taking into account the posterior covariance matrix of differences between model predictions. *Chemical Engineering Science* **63**(9):2408–2419.
- Swinney DC. 2009. The role of binding kinetics in therapeutically useful drug action. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**(1):31-9.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

6.1 Méthode d'injection de plusieurs analytes :

Durant les deux dernières décennies la SPR est devenue la méthode de choix pour l'étude des interactions entre macromolécules (Danielson 2009; Rich and Myszka 2010; Tanious *et al.*, 2008). Ceci est rendu possible par les progrès remarquable fournissant aux chercheurs des outils totalement automatisés (Rich and Myszka 2007), plus sensible (Myszka 2004; Papalia *et al.*, 2006) combinés avec des protocoles optimisés (De Crescenzo *et al.*, 2008b; Karlsson *et al.*, 2006; Myszka 1999) et des logiciels robustes pour le traitement de données (Gorshkova *et al.*, 2008; Myszka and Morton 1998; O'Connor-McCourt *et al.*, 1998) pour une exploitation optimale du potentiel des mesures en temps réel des interaction entre macromolécules.

Afin d'intégrer la SPR dans le processus de développement de nouvelles molécules thérapeutiques, les dernières générations de biocapteurs SPR misent sur l'augmentation de la vitesse de criblage des échantillons. De nouvelles plateformes, permettant de tester un échantillon versus plusieurs partenaires biologiques ou plusieurs échantillons sur plusieurs surfaces, ont été développées (Rich and Myszka 2007). Ces nouveaux outils peuvent être très utiles pour le criblage à haut débit. Cependant la qualité des analyses cinétiques avec ces nouveaux instruments est beaucoup plus basse que celle des biocapteurs classiques à faible vitesse de criblage. Ces derniers analysent les données générées par l'injection de 5 à 10 différents échantillons d'analyte en variant la concentrations sur une large plage. Cependant, Önell et Andersson (2005) ont démontré que deux injections bien choisies permettent l'identification des constantes cinétiques

avec le même niveau de confiance. Dans le même esprit, De Crescenzo *et al.* (2008b) ont démontré que l'exploitation du potentiel des biocapteurs SPR en terme de collection de données, combiné avec une planification expérimentale optimale permet une identification des constantes cinétiques avec le même niveau de confiance tout en réduisant considérablement le temps d'expérience et la consommation de matériel. En parfaite accord avec les conclusions d'Ö'nell et Andersson, ces résultats démontrent qu'une ou deux injections sont suffisantes pour identifier les constantes cinétiques avec le même niveau de confiance que l'expérimentation classique. La titration en série proposée pour résoudre des problèmes liés à la régénération de surface, pourrait aussi permettre de réaliser un gain en terme de temps d'expérience. En effet, cette technique expérimentale consiste à injecter en série des concentrations croissantes sans injection de tampon ni de solution de régénération entre les injections. Cette série d'injection est suivie d'une injection de tampon et si possible une étape finale de régénération (au lieu d'une après chaque injection d'analyte). Cependant, la prise en compte du temps nécessaire pour la double référenciation joue en défaveur de cette stratégie puisqu'il faut toujours réaliser plusieurs injections de tampon à des fins de soustraction.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons poussé l'optimisation de l'expérimentation SPR une étape plus loin en combinant l'optimisation numérique avec une idée novatrice qui consiste en l'injection simultanée de deux analytes. De façon intuitive, injecter deux analytes simultanément complique le modèle mathématique qui décrit l'interaction; le nombre de paramètres augmentant, il était attendu que la confiance sur les constantes cinétiques identifiées diminuerait. L'injection de deux analytes ne garantissait donc pas la réduction du temps expérimental. Cependant, nous avons démontré que la combinaison d'une optimisation en ligne, basée sur le niveau de confiance et l'identification de paramètres, combinée à l'injection de deux

analytes réduit considérablement le temps d'expérience et la consommation de matériel, ce qui augmente la vitesse de criblage de la SPR.

Premièrement, pour valider le modèle nous avons choisi différents cas d'études correspondant à la combinaison de trois analytes (CBS, BDS, sulfanilamide) qui inhibent l'enzyme CA II afin d'avoir : i) k_{a1} , k_{a2} similaires et k_{d1} , k_{d2} similaires (CBS-sulfanilamide à 18 °C), ii) k_{a1} , k_{a2} différents et k_{d1} , k_{d2} similaires (BDS-sulfanilamide à 12 °C), iii) k_{a1} , k_{a2} similaires et k_{d1} , k_{d2} sont différents (CBS-sulfanilamide à 12 °C), iv) k_{a1} , k_{a2} différents et k_{d1} , k_{d2} différents (CBS-BDS à 12 °C). Différentes combinaisons de concentration pour chaque couple sont choisies afin de couvrir le domaine de concentration de chaque analyte. Les interactions entre chaque analyte et l'enzyme CA II sont décrites par un modèle simple (Day *et al.*, 2002; Navratilova *et al.*, 2007). Des expériences classiques entre chaque analyte et le ligand ont été réalisées (même surface et même température que dans chaque cas énuméré précédemment) afin de valider les valeurs des constantes cinétiques identifiées avec le modèle. Comme souligné dans le chapitre 3, l'interaction est bien décrite par le modèle développé. Par ailleurs les constantes cinétiques identifiées à partir de la méthode classique, ainsi que les confiances associées, sont comparable à celles identifiées avec l'injection simultanée de deux analytes. Dans tous les cas de Figure, les déviations entre les deux modes opératoires sont inférieures à 17 %. Les confiances sur les constantes cinétiques identifiées sont similaires aux confiances des constantes cinétiques identifiées en utilisant la méthode classique. Les corrélations entre les paramètres sont prises en compte indirectement en calcul l'inverse de la matrice d'information de Fisher (MIF). Les éléments hors de la diagonale de la MIF donnent plus d'information sur les corrélations entre les paramètres et leur identifiable. Cependant, ces derniers n'ont pas été analysés parce que notre méthode force la converge vers les constantes cinétiques non biaisées en choisissant

adéquatement les estimées initiales. En effet, le point de départ de la recherche de paramètres est le vecteur contenant les paramètres correspondant aux injections des analytes séparément contenues dans le plan expérimental.

Une fois le modèle validé, l'algorithme d'optimisation présenté dans le chapitre 3 a été appliqué aux différents cas d'étude présentés précédemment. Pour fin de comparaison, des expériences classiques optimisées ont été réalisées selon le protocole proposé par De Crescenzo *et al.*, 2008b pour chaque analyte qui compose les couples des cas d'études sur la même surface et même température. Pour les deux modes opératoires optimisés, les constantes cinétiques identifiées sont comparables entre elles et elles sont comparables aux cinétiques identifiées à partir de l'expérimentation classique. Les expériences les plus longues sont celles qui correspondent aux cas i et ii, où les cinétiques d'association (et de dissociation pour le cas ii) sont similaires. Dans ces cas, les expériences sont plus longues parce que la discrimination entre R_{max} et chaque constante cinétique d'association a besoin de plus de temps, en adéquation avec les conclusions de De Crescenzo *et al.*, 2008b. En outre, plus de temps est nécessaire pour discriminer entre les constantes d'association. Les expériences optimales les plus courtes sont observées dans les cas iii et iv, où les constantes cinétiques d'association (et de dissociation dans le cas iv) sont différentes. Le premier gain observé est la réduction 20 % du temps d'expérience sans aucune optimisation en utilisant l'injection de deux analytes tout en gardant une bonne confiance sur les constantes cinétiques. La méthode basée sur l'injection de deux analytes va encore plus loin. Quand la méthode de De Crescenzo *et al.*, 2008b donne des expériences de 2.17 à 2.9 plus rapides et de 1.36 à 4.47 d'économie sur la consommation de matériel, la méthode d'injection de multiples analytes donne des expériences 2.61 à 3.89 plus rapides et de 2.38 à 11.29 d'économie sur la consommation de matériel. Cette réduction de temps est principalement due aux économies

de temps lors de la double référencement. Vu qu'on utilise les mêmes injections de tampons pour la double référencement des injections non-optimisées on économise 4 injections (4 temps de cycle) et 4 autres injections pour la double référencement des injections optimisées. Ajouter à cela les différences entre les différentes injections optimisées pour les deux modes opératoires, on se retrouve avec des gains considérables.

Le modèle, présenté dans le chapitre 3, décrivant ce mode opératoire présentent des déviations sur les constantes cinétiques inférieurs à 17.11% comparativement à la méthode classique. Bien qu'acceptable, cette déviation est plus élevée que celle rapportées pour des duplicatas indépendant, soit moins de 10 % (Navratilova *et al.*, 2007). Dans le chapitre 4 nous avons démontré que cette déviation est due à l'hypothèse de proportionnalité entre le signal et l'accumulation de masse. Cette proportionnalité s'avère incorrect, spécialement dans le cas de molécules à faible poids moléculaire. Pour résoudre ce problème, un nouveau modèle décrivant l'injection de multiples analytes et réduisant les déviations sur les constantes cinétiques à moins de 10 % a été développé. Ce modèle est présenté dans le chapitre 4.

Pour vérifier l'hypothèse de la corrélation linéaire entre le poids moléculaire et le signal SPR correspondant à l'interaction d'un analyte donné avec son partenaire biologique immobilisé sur une surface, nous avons immobilisé l'enzyme CAII à la surface du biocapteur et nous avons étudié l'interaction de cette dernière avec ses différents inhibiteurs qui ont des poids moléculaires différents. CBS, BDS, DNSA, sulphanilamide, sulpiride, furosemide et acetazolamine ont été sélectionnées pour un spectre de poids moléculaire allant de 172 to 341.43 g/mol. Chaque molécule a été injecté à une concentration qui permet la saturation de la surface (Cannon *et al.*, 2004a; Day *et al.*, 2002; Myszka 2004; Navratilova *et al.*, 2007). Les résultats présentés dans le chapitre 4 réfutent l'hypothèse de la proportionnalité. Par exemple, le CBS et l'Acetazolamide

ont un signal à la saturation inférieur à celui du Sulphanilamide alors que le poids moléculaire de ce dernier est de 14.51 % et 22.60% inférieur à celui du CBS et de l'Acetazolamide respectivement. Nous avons observé la même chose pour le Furosemide versus le Sulpiride et le DNSA. Cette expérience montre clairement que la pondération entre le poids moléculaire et le signal utilisé pour construire le modèle présenté dans le chapitre 4 n'est pas pertinente. L'utilisation des poids moléculaires comme facteur de pondération introduit donc un biais lors de l'identification des paramètres, ce qui explique la déviation plus élevée que celle rapportée dans la littérature.

En se basant sur cette observation, nous avons proposé un modèle présenté dans le chapitre 4. Dans ce modèle le rapport entre les niveaux de saturation et l'accumulation de masse de chaque analyte, α , est estimé à la place de l'utilisation des poids moléculaires comme facteur de pondération.

Pour la validation de ce modèle, nous avons procédé à l'injection de plusieurs paires d'analytes (CBS, sulpiride), (CBS, furosemide), (BDS, sulpiride), (BDS, furosemide), (sulphanilamide, sulpiride), (sulphanilamide, furosemide) et (sulpiride, furosemide) sur une surface CA II active à 18°C conformément au plan expérimental décrit dans le chapitre 4. L'analyse des données expérimentales avec le nouveau modèle montre que ce dernier est parfaitement adéquat. Ce modèle ramène les déviations à moins de 9 %. Ceci est combiné à un ajustement des courbes simulées aux données expérimentales de très bonnes qualités; le nouveau modèle décrit aussi parfaitement des interactions complexes correspondant à des sensorgrammes qui contiennent des bosses durant la phase d'association (chapitre 4), ces bosses apparaissant quand l'inhibiteur ayant le plus haut R_{max} a des cinétiques plus rapides que celles de l'autre analyte. Pour chaque ensemble de données, il est possible de calculer la valeur

expérimentale de α (rapports entre les signaux de chaque molécule à saturation). Cette valeur est en très bonne adéquation avec la valeur identifiée à partir du modèle. De plus, la vitesse de criblage de la méthode d'injection de plusieurs analytes optimisée proposée dans le chapitre 3 n'est pas affectée par l'introduction du paramètre α .

6.2 Optimisation avec discrimination de modèle de la résonance plasmonique de surface :

Les résultats de De Crescenzo *et al.*, 2008b démontrent que quand l'interaction suit un modèle simple, deux ou trois injections soigneusement planifiées peuvent répondre aux exigences de confiance. Cependant, l'utilisation du modèle simple quand l'interaction est limitée par le transfert de masse n'est pas pertinente (Goldstein *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 1999). En effet, ce modèle ne décrira pas convenablement les données expérimentales et les constantes cinétiques seront biaisées. D'un autre côté, le remplacement du modèle simple par le modèle à deux compartiments qui tient compte de la limitation par transfert de masse (modèle MTL), conduira à des expériences plus longues. Le modèle MTL divise la cellule microfluidique en deux compartiments : un compartiment où la concentration de l'analyte est constante et égale à la concentration d'injection et un autre où la concentration varie avec le temps. Ce modèle a donc quatre paramètres avec deux équations différentielles ordinaires ; une décrit la diffusion entre les deux compartiments et l'autre l'interaction entre le ligand et l'analyte. Le modèle simple possède une équation différentielle ordinaire à trois paramètres. L'augmentation du nombre de paramètres influence négativement la confiance. Comme le temps d'expérience du protocole optimisé dépend de la confiance, le remplacement direct du simple par le modèle MTL augmentera la durée des expériences. Ceci démontre que le choix du modèle est primordial lors de

l'optimisation des expériences SPR. Goldstein *et al.*, 1999 ont introduit le nombre adimensionnel θ pour départager les deux modèles. Ce nombre représente un rapport entre la vitesse de diffusion et la cinétique de la réaction. Ces auteurs rapportent que quand $\theta < 1$, l'interaction n'est pas influencée par la limitation de transfert de masse. Si le critère de discrimination est que le modèle décrit l'expérience alors $\theta < 1$ est un bon critère. Cependant, nous avons observé lors de nos simulations que quand $0.1 < \theta < 1$ les ajustements des courbes simulées aux données expérimentales sont de même qualité avec les deux modèles mais les constantes cinétiques sont affectées. Si le modèle simple est utilisé pour calculer les constantes cinétiques correspondant aux données générées avec le modèle MTL, les constantes cinétiques équivalentes identifiées sont $k_a^e = \frac{k_a}{1+\theta}$ et $k_d^e = \frac{k_d}{1+\theta}$. On voit clairement ici que les constantes cinétiques peuvent être biaisées et avoir une déviation proche de 50 % quand θ est proche de 1. Pour minimiser ce biais nous avons fixé notre critère de discrimination à $\theta = 0.1$.

L'hypothèse réfutant le remplacement direct du modèle simple par le modèle MTL dans l'algorithme d'optimisation, a été vérifiée pour trois différents cas : i) pas de limitation par transfert de masse ($\theta = 0,051$), ii) faible limitation par transfert de masse ($\theta = 0,5$) et iii) forte limitation par transfert de masse ($\theta = 2$). Dans tous les cas de Figure k_a , k_d et R_{max} sont respectivement égaux à $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 10^{-3} s^{-1} et 50 RU. Pour chaque cas, les contraintes sur la confiance correspondent à la confiance de l'expérimentation classique, elles ont été calculées en utilisant le modèle qui décrit l'interaction (modèle simple pour $\theta = 0.05$ et modèle MTL pour $\theta = 0.5$ et $\theta = 2$). D'après les résultats des simulations présentés dans le chapitre 5, les expériences sont longues et dans le cas où la limitation par transfert de masse n'influence pas l'interaction ($\theta = 0.05$) les confiances sur les constantes cinétiques n'ont pas été respectées. Ceci est dû au modèle utilisé. En effet, dans le dernier cas de Figure, les contraintes ont été calculées en utilisant

le modèle simple tandis que l'algorithme calcule les confiances avec le modèle MTL. Or, ce dernier aura toujours une confiance inférieure à celle du modèle simple parce qu'il possède plus de paramètres. Pour atteindre le niveau de confiance désiré, il faut augmenter le temps d'expérience sans toutefois être sûr d'atteindre le niveau de confiance voulu.

Comme discuté ci-haut, le remplacement direct du modèle simple par le modèle MTL dans l'algorithme d'optimisation conduirait à une augmentation non-nécessaire du temps d'expérience et des problèmes au niveau de la confiance sur les paramètres. Pour palier à ce problème, deux approches utilisant des algorithmes combinant l'optimisation numérique et la discrimination de modèle pour résoudre le problème ont été présentées dans le chapitre 5. L'approche 1 est idéale pour la discrimination entre les deux modèles, comme les contraintes sur les constantes cinétiques sont relaxées, les injections correspondant à la discrimination sont très rapides. Comme aucune amélioration n'a été apportée sur la confiance des constantes cinétiques durant l'étape de discrimination, les injections pour l'optimisation des expériences sont très longues, ce qui prolonge le temps d'expérience. Dans l'approche 2, les contraintes sur la confiance des constantes cinétiques n'ont pas été relaxées dans l'étape de discrimination. Mais elles ne sont pas aussi strictes que pour l'étape d'optimisation. Cette contrainte plus forte imposée sur la confiance dès l'étape de discrimination améliore la confiance sur les constantes cinétiques sans grande augmentation du temps pour la discrimination. Ce gain en confiance accélère les injections pour l'optimisation de l'expérience. Cette approche présente un compromis entre la discrimination de modèle et l'optimisation. Cette approche a été validée expérimentalement.

Le système biologique choisi pour la validation expérimentale doit couvrir les trois cas simulés i) pas de limitation par transfert de masse ($\theta=0,051$), ii) faible limitation par transfert de

masse ($\theta=0,5$) et iii) forte limitation par transfert de masse ($\theta=2$). L'enzyme CAII et ces différents inhibiteurs a permis de couvrir ces différents cas d'étude (Cannon *et al.*, 2004a; Mehand and Srinivasan 2012; Navratilova *et al.*, 2007). Les interactions entre CAII et CBS, CAII et Sulfanilamide et CAII et BDS à 18 °C avec un flux de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ sont décrites par un modèle simple (Navratilova *et al.*, 2007). L'interaction entre CAII et Acetazolamide est décrite par le modèle MTL (Cannon *et al.*, 2004). Pour nos expériences CBS et Sulfanilamide ont été injectés à un débit de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ tandis que BDS et Acetazolamide ont été injectés à un débit de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Le débit d'injection de BDS et d'Acetazolamide ont été diminués afin de générer la limitation par transfert de masse dans le cas du BDS (augmenter θ) et de la renforcer dans le cas de l'Acetazolamide.

Les données générées ont été analysées avec le modèle MTL et le modèle simple. Le modèle MTL décrit parfaitement toutes les interactions. De la même manière, le modèle simple décrit parfaitement les données pour les interactions entre le CA II et CBS, Sulfanilamide et BDS cependant ce modèle ne décrit pas les données correspondant à l'interaction entre le CAII et l'Acetazolamide. Les constantes cinétiques identifiées avec le modèle MTL et le modèle simple sont similaires pour les interactions entre CA II et CBS et Sulfanilamide tandis qu'elles présentent un biais de 15 % pour l'interaction du CA II avec le BDS. Ce biais augmente jusqu'à 74% pour l'interaction entre le CA II et l' Acetazolamide. Ces observation sont prévisibles ; en effet pour l'interaction entre le CA II et le CBS, Sulfanilamide les valeurs de θ sont respectivement de 0,06 et $3,61 * 10^{-6}$ ce qui signifie que la limitation par transfert de masse n'influence pas l'interaction. La même observation a été faite en simulation, quand θ est inférieur à 0,1 les deux modèles décrivent parfaitement bien les données avec des constantes cinétiques similaires (la différence est inférieure à 5%). Si on observe l'interaction entre CA II et le BDS $\theta =$

0.28, la limitation par transfert de masse influence partiellement l'interaction. Comme pour les simulations, quand $0.1 < \theta < 1$ les deux modèles décrivent les données mais les constantes cinétiques du modèle simple divergent. Si on se penche sur les modèles, on remarque que le modèle MTL correspond au modèle simple quand la concentration ne varie pas avec le temps dans le compartiment où la réaction a lieu. Les constantes cinétiques équivalentes identifiées correspondent à $k_a^e = \frac{k_a}{1+\theta}$ et $k_d^e = \frac{k_d}{1+\theta}$. Le modèle simple converge vers k_a^e et k_d^e au lieu de k_a et k_d , ce qui explique le biais sur les constantes cinétiques. Pour être le plus précis possible, nous avons fixé $\theta=0.1$ comme frontière entre les deux modèles. Pour l'interaction entre CA II et l'Acetazolamide, la forme des sensorgrammes présentés dans le chapitre 5 montre clairement l'influence de la limitation par transfert de masse. Pour cette interaction la valeur de θ est de 4,82 ce qui confirme l'influence de la limitation par transfert de masse sur l'interaction et explique le biais observé sur les constantes cinétiques identifiées avec le modèle simple.

Ces observations nous confortent dans la nécessité et l'utilité de l'approche 2 qui résout le problème entre choix du modèle et l'optimisation de l'expérience.

Validation expérimentale de l'approche 2

L'approche 2 a été appliquée aux quatre systèmes cités ci-haut. Pour tous les cas de Figure une seule injection était nécessaire pour le choix du modèle. Une fois le modèle choisi, une seule autre injection était nécessaire pour optimiser l'expérience. Les constantes cinétiques identifiées ne sont pas biaisées et elles sont similaires à celles identifiées avec la méthode classique et celles de la littérature (Mehand and Srinivasan 2012; Navratilova *et al.*, 2007). Grâce au design de l'approche 2 les injections sont courtes à la fois pour la discrimination de modèle et l'optimisation. En effet, la confiance sur les constantes cinétiques se trouvent améliorée dès

l'étape de discrimination ce qui raccourcit grandement les injections pour l'optimisation. Contrairement à nos attentes, le temps d'expérience n'est pas prolongé par rapport à la méthode de De Crescenzo *et al.*, 2008b. Le ratio du temps entre la méthode classique et la méthode optimisée est 2.15-3.09 ce qui correspond au ratio du temps de la méthode de Crescenzo *et al.*, 2008b (1.8-3.2). Ce résultat n'était pas attendu, vu que l'approche de De Crescenzo *et al.*, 2008b utilise le modèle simple qui donne des expériences optimisées plus rapides. Cependant, l'approche 2 est conçue de manière à avoir des injections très courtes pour la discrimination de modèle et l'optimisation. Les durées des injections conjuguées avec la double référenciation donne des temps d'expérience similaires pour les deux méthodes.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Conclusion

Durant les deux dernières décennies la SPR est devenue la méthode de choix pour la caractérisation des interactions entre biomolécules. En plus de la caractérisation de l'affinité entre les molécules en interaction, la capacité de la SPR à suivre les interactions en temps réel permet la détermination des constantes cinétiques avec une grande confiance. L'essor de cette méthode a été avantage par la facilité de récolter des données expérimentales sans utilisation d'étiquettes, la disponibilité d'une panoplie de protocoles pour l'immobilisation d'une des espèces en interaction et la limite de détection qui permet l'étude des interactions avec des composants de faible poids moléculaire. À cela s'ajoute les protocoles expérimentaux optimaux et automatisés s'appuyant sur des unités de traitement de données très robustes. Dans le cadre de cette thèse, un effort particulier a été porté sur les protocoles expérimentaux et les unités de traitement de données afin d'augmenter la vitesse de criblage de la méthode et de réduire la consommation de matériel. Pour ce faire, une idée simple a été mise en application : profiter des multiples interactions qu'une molécule peut avoir avec plusieurs composés en procédant à l'injection de deux analytes simultanément sur une surface active au lieu d'un à la fois (Si Mehand *et al.*, 2012). Premièrement l'interaction ligand versus deux analytes a été modélisée et

le modèle a été validé avec des déviations inférieures à 17 % sur les constantes cinétiques identifiées. Nous avons remarqué que ce protocole expérimental non optimisé réduit le temps d'expérience de 20 % par rapport à la méthode classique non optimisée. Une fois le modèle validé, un protocole expérimental optimal a été mis au point en s'appuyant sur une optimisation numérique sous contraintes des confiances voulues sur les constantes cinétiques et l'identification de paramètres. Ce protocole expérimental réduit drastiquement le temps d'expérience et la consommation de matériel. Les expériences peuvent être de 2,89 à 3,87 fois plus rapides pour une consommation de matériel réduite de 2,38 à 11,29 fois, contre des expériences 1,97 à 2,64 fois plus rapides et une consommation de matériel réduite de 1,37 à 4,75 fois pour la méthode de De Crescenzo *et al.*, 2008b.

La mise au point de la méthode d'injection de plusieurs analytes a été basée sur un modèle construit en se basant sur le principe de la proportionnalité entre le signal SPR et le poids moléculaire des composants. Cependant, nous avons démontré que l'amplitude du signal SPR n'est pas proportionnelle au poids moléculaire dans le cas des composants de faible poids moléculaire. Cette erreur de modélisation n'affecte pas l'identification des constantes cinétiques dans le cas de l'approche classique mais lors d'injection de deux analytes simultanément les constantes cinétiques peuvent être biaisées. Cependant, l'introduction du paramètre global (α) correspondant au ratio entre les valeurs de R_{max} résout le problème sans affecter la vitesse de criblage de la méthode optimisée d'injection de plusieurs analytes simultanément.

Les méthodes optimisées de De Crescenzo *et al.*, 2008b et Si Mehand *et al.*, 2012 sont basées sur des modèles simples qui ne tiennent pas compte de la limitation par transfert de masse. Or l'utilisation du modèle simple quand l'interaction est limitée par transfert de masse peut biaiser les constantes cinétiques identifiées. Dans le cadre de ce doctorat, nous nous sommes

penchés sur ce phénomène et nous avons développé une méthode qui optimise l'expérimentation classique en choisissant le modèle qui décrit l'interaction. Cette nouvelle approche expérimentale marie optimisation et discrimination de modèle, elle est conçue pour toujours trouver des injections courtes. Ce design optimal nous donne des expériences toutes aussi rapides que les expériences conduites avec le protocole de De Crescenzo *et al.*, 2008b.

7.2 Recommandations

1. Pour compléter le travail effectué, il serait d'abord souhaitable de se pencher sur l'implémentation automatique des protocoles développés dans les chapitres 3 et 5.

2. La méthode d'injection de plusieurs analytes peut présenter une limitation par transfert de masse, dans ce cas, les problèmes exposés dans le chapitre 5 vont altérer la qualité des constantes cinétiques. L'adaptation de l'algorithme présenté dans le chapitre 5 à ce mode expérimental apportera des solutions. Cependant, cette adaptation entraînera certain nombre de difficultés : i) Comment modéliser l'interaction entre ligand et les deux analytes en tenant compte de la limitation par transfert de masse ? ii) est-ce que l'interaction du ligand avec les deux analytes présente une limitation par transfert de masse ou bien juste l'interaction avec un seul analyte est limitée par transfert de masse ? ; iii) comment choisir les critères de discrimination ? iv) est-ce que l'augmentation du nombre de paramètres permettra l'identification des constantes cinétiques avec une confiance acceptable ? v) est-ce que cette méthode sera plus avantageuse que la méthode présenté dans le chapitre 5 ?

3. Il serait intéressant de se pencher sur la méthode de la titration en série si on considère les gains potentiels qu'elle peut apporter en terme de temps d'expérience. Deux problèmes

peuvent se poser. Le premier est relatif aux injections nécessaires pour la double référenciation. Le second concerne son optimisation. En effet, l'injection non optimisée initiale ne doit pas conduire à la saturation de la surface car la recherche de l'injection optimale en serait d'autant plus difficile.

4. Une idée prometteuse pour la réduction du temps d'expérience est de faire réagir l'analyte et le ligand en solution et de les injecter par la suite. En effet, le mélange préalable des deux partenaires biologiques apporterait une information thermodynamique supplémentaire, ce qui augmenterait la confiance sur les constantes cinétiques et réduirait par conséquent le nombre de données expérimentales à récolter afin de satisfaire le niveau de confiance sur les constantes cinétiques. Les solutions optimisées qui seront développées pour la titration en série et le mélange en solution du ligand et de l'analyte doivent tenir compte de la limitation par transfert de masse et doivent tenir compte des points soulevés dans le chapitre 5.

BIBLIOGRAPHIE

-
- Abbas A, Linman MJ, Cheng Q. 2011. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosens Bioelectron* **26**(5):1815-24.
- Abd El-Monsef MME, Seyam MM. 2011. CDT-optimum designs for model discrimination, parameter estimation and estimation of a parametric function. *Journal of Statistical Planning and Inference* **141**(2): 639–643.
- Alberton A, Schwaab M, Lobao MWN, Pinto J. 2011. Experimental design for the joint model discrimination and precise parameter estimation through information measures. *Chemical Engineering Science* **66**(9):1940–1952.
- Andersson K, Hamalainen M. 1999. Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. *Analytical Chemistry* **71**(13):2475.
- Atkinson AC. 2008. Journal of Statistical Planning and Inference. *Journal of Statistical Planning and Inference* **138**(1):56–64.
- Baird CL, Myszka DG. 2001. Current and emerging commercial optical biosensors. *Journal of Molecular Recognition* **14**(5):261-268.
- Biacore. 2006a. Sensor Surface Handbook. Biacore: Uppsala.
- Biacore. 2006b. Biacore T100 Software Handbook. Biacore: Uppsala.
- Bich C, Scott M, Panagiotidis A, Wenzel RJ, Nazabal A, Zenobi R. 2008a. Characterization of antibody-antigen interactions: comparison between surface plasmon resonance measurements and high-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **375**(1):35-45.
- Bich C, Scott M, Panagiotidis A, Wenzel R, Nazabal A, Zenobi R. 2008b. Characterization of antibody-antigen interactions: comparison between surface. *Anal Biochem* **375**(1):35-45.
- Biosensing-Instrument. 2012. Surface Plasmon Resonance v. Quartz Crystal Microbalance.
- Bowles MR, Hall DR, Pond SM, Winzor DJ. 1997. Studies of protein interactions by biosensor technology: an alternative approach to the analysis of sensorgrams deviating from pseudo-first-order kinetic behavior. *Anal Biochem* **244**(1):133-43.

- Candresse T, Lot H, German-Retana S, Krause-Sakate R, Thomas J, Souche S, Delaunay T, Lanneau M, Le Gall O. 2007. Analysis of the serological variability of Lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. *J Gen Virol* **88**(Pt 9):2605-10.
- Cannon MJ, Williams AD, Wetzel R, Myszka DG. 2004a. Kinetic analysis of beta-amyloid fibril elongation. *Analytical Biochemistry* **328**(1):67-75.
- Cannon MJ, Papalia GA, Navratilova I, Fisher RJ, Roberts LR, Worthy KM, Stephen AG, Marchesini GR, Collins EJ, Casper D and others. 2004b. Comparative analyses of a small molecule/enzyme interaction by multiple users of Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **330**(1):98-113.
- Chavane N, Jacquemart R, Hoemann CD, Jolicoeur M, De Crescenzo G. 2008. At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analytical Biochemistry* **378**(2):158-165.
- Chen Z, Tang D. 2007. Antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors based. *Bioprocess Biosyst Eng* **30**(4):243-9.
- Choulier L, Andersson K, Hamalainen MD, van Regenmortel MH, Malmqvist M, Altschuh D. 2002. QSAR studies applied to the prediction of antigen-antibody interaction kinetics as measured by BIACORE. *Protein Eng* **15**(5):373-82.
- Danielson UH. 2009. Integrating surface plasmon resonance biosensor-based interaction kinetic analyses into the lead discovery and optimization process. *Future Med Chem* **1**(8):1399-414.
- Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszka DG. 2002. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Science* **11**(5):1017-1025.
- De Crescenzo G, O'Connor MD, Paul-Roc B, Zwaagstra J, Banville M, Jaramillo M; National Research Council of Canada, Can., assignee. 2005. Coiled-coil fusion proteins comprising cell surface receptor domains and uses for selecting compounds for inhibiting ligand binding and kinase activity. WO patent 2005024035.
- De Crescenzo G, Woodward L, Srinivasan B. 2008a. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *Journal of Molecular Recognition* **21**(4):256-266.
- De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: Effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry* **42**(6):1754-1763.
- De Crescenzo G, Grothe S, Lortie R, Debanne M, O' Connor-McCourt M. 2000. Real-time kinetic studies on the interaction of transforming growth factor alpha with the epidermal growth factor receptor extracellular domain reveal a conformational change model. *Biochemistry* **39**(31):9466-76.
- De Crescenzo G, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M. 2008b. Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors : principle and emerging trends. *Cellular and Molecular Bioengineering* **1**(4):204-215.

- De Crescenzo G, Grothe S, Zwaagstra J, Tsang M, O'Connor-McCourt MD. 2001. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *Journal of Biological Chemistry* **276**(32):29632-29643.
- De Genst E, Areskoug D, Decanniere K, Muyldermans S, Andersson K. 2002. Kinetic and affinity predictions of a protein-protein interaction using multivariate experimental design. *J Biol Chem* **277**(33):29897-907.
- Deo RC, Sonenberg N, Burley SK. 2001. X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: an ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8):4414-9.
- Di Primo C, Lebars I. 2007. Determination of refractive index increment ratios for protein-nucleic acid complexes by surface plasmon resonance. *Anal Biochem* **368**(2):148-55.
- Dochain D, Vanrolleghem. 2001. Dynamical modelling and estimation in wastewater treatment processes. . IWA Publishing.: Londres, Royaume-Uni
- Edgar TF, Himmelblau DM. 1988. Optimization of chemical processes. Thomas E. Casson: New York.
- Englebienne E, Van Hoonacker A, Verhas M. 2003. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. . *Spectroscopy* **17** 255–273.
- Fisher RJ, Fivash M. 1994. Surface plasmon resonance based methods for measuring the kinetics and binding affinities of biomolecular interactions. *Curr Opin Biotechnol* **5**(4):389-95.
- Gervais T, Jensen KF. 2006. Mass transport and surface reactions in microfluidic systems. *Chemical Engineering Science* **61**(4):1102-1121.
- Geschwindner S, Carlsson JF, Knecht W. 2012. Application of optical biosensors in small-molecule screening activities. *Sensors (Basel)* **12**(4):4311-23.
- Glaser RW. 2000. Biosensors and Their Applications. In: C.Y. V, T.N T, editors. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Goldstein B, Coombs D, He X, Pineda AR, Wofsy C. 1999. The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore. *J Mol Recognit* **12**(5):293-9.
- Gorshkova II, Svitel J, Razjouyan F, Schuck P. 2008. Bayesian Analysis of Heterogeneity in the Distribution of Binding Properties of Immobilized Surface Sites. *Langmuir* **24**(20):11577-11586.
- Gronewold T, Baumgartner A, Weckmann A, Knekties J, Egler C. 2009. Selection process generating peptide aptamers and analysis of their binding to the TiO₂ surface of a surface acoustic wave sensor. *Acta Biomater* **5**(2):794-800.
- Guo X. 2012. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *J Biophotonics*.
- Hahnefeld C, Drewianka S, Herberg F. 2004. Determination of Kinetic Data Using Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Methods Mol Med* **94**:299-320.

- Hoà XD, Kirk AG, Tabrizian M. 2007. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens Bioelectron* **23**(2):151-60.
- Holdgate GA, Gill AL. 2011. Kinetic efficiency: the missing metric for enhancing compound quality? *Drug Discov Today* **16**(21-22):910-3.
- Holdgate GA, Anderson M, Edfeldt F, Geschwindner S. 2010. Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: matching high information content with high throughput. *J Struct Biol* **172**(1):142-57.
- Homola I. 2006. Electromagnetic Theory of Surface Plasmons. In: Wolfbeis IOS, editor. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer. p 3-44)
- Hrtska SC, Kemp MM, Munoz EM, Azizad O, Banerjee M, Raposo C, Kumaran J, Ghosh P, Linhardt RJ. 2007. Investigation of the mechanism of binding between internalin B and heparin using surface plasmon resonance. *Biochemistry* **46**(10):2697-706.
- Ito S, Imura T, Fukuoka T, Morita T, Sakai H, Abe M, Kitamoto D. 2007. Kinetic studies on the interactions between glycolipid biosurfactant assembled monolayers and various classes of immunoglobulins using surface plasmon resonance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **58**(2):165-171.
- Jia Y, Kumar A, Patel SS. 1996. Equilibrium and stopped-flow kinetic studies of interaction between T7 RNA polymerase and its promoters measured by protein and 2-aminopurine fluorescence changes. *J Biol Chem* **271**(48):30451-8.
- Karlsson R, Falt A. 1997. Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods* **200**(1-2):121-33.
- Karlsson R. 1999. Affinity analysis of non-steady-state data obtained under mass transport limited conditions using BIAcore technology. *J Mol Recognit* **12**(5):285-92.
- Karlsson R, Larsson A. 2004. Affinity measurement using surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol* **248**:389-415.
- Karlsson R, Fägerstam L, Nilshans H, Persson B. 1993. Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *Journal of Immunological Methods* **166**(1):75-84.
- Karlsson R, Katsamba PS, Nordin H, Pol E, Myszkowski DG. 2006. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Analytical Biochemistry* **349**(1):136-147.
- Kelly L, Birken S, Puett D. 2007. Determination of hyperglycosylated human chorionic gonadotropin produced by malignant gestational trophoblastic neoplasias and male germ cell tumors using a lectin-based immunoassay and surface plasmon resonance. *Mol Cell Endocrinol* **262**:33-9.
- Kernstock RM, Girotti AW. 2007. Lipid transfer protein binding of unmodified natural lipids as assessed by surface plasmon resonance methodology. *Anal Biochem* **365**(1):111-21.
- Khalifa MB, Choulier L, Lortat-Jacob H, Altschuh D, Vernet T. 2001. BIACORE Data Processing: An Evaluation of the Global Fitting Procedure. *Analytical Biochemistry* **293**(2):194-203.

- Kozlov G, De Crescenzo G, Lim NS, Siddiqui N, Fantus D, Kahvejian A, Trempe J-F, Elias D, Ekiel I, Sonenberg N and others. 2004. Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO Journal* **23**(2):272-281.
- Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K. 2001. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8):4409-13.
- Kozlov G, Siddiqui N, Coillet-Matillon S, Trempe JF, Ekiel I, Sprules T, Gehring K. 2002. Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **277**(25):22822-8.
- Kramer R, Lenferink A, van Bueren-Koornneef I, van der Meer A, van de Poll M, van Zoelen E. 1994. Identification of the high affinity binding site of transforming growth factor- α (TGF- α) for the chicken epidermal growth factor (EGF) receptor using EGF/TGF- α chimeras. *J Biol Chem* **269**(12):8708-11.
- Krogsgaard M, Prado N, Adams EJ, He XL, Chow DC, Wilson DB, Garcia KC, Davis MM. 2003. Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation. *Mol Cell* **12**(6):1367-78.
- Ladbury JE, Klebe G, Freire E. 2010. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat Rev Drug Discov* **9**(1):23-7.
- Lange K, Rapp BE, Rapp M. 2008. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Anal Bioanal Chem* **391**(5):1509-19.
- Lenferink AE, van Zoelen EJ, van Vugt MJ, Grothe S, van Rotterdam W, van De Poll ML, O'Connor-McCourt MD. 2000. Superagonistic activation of ErbB-1 by EGF-related growth factors with enhanced association and dissociation rate constants. *J Biol Chem* **275**(35):26748-53.
- Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. 1983. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **4**(2):299-304.
- Lim NS, Kozlov G, Chang T-C, Groover O, Siddiqui N, Volpon L, De Crescenzo G, Shyu A-B, Gehring K. 2006. Comparative peptide binding studies of the PABC domains from the ubiquitin-protein isopeptide ligase HYD and Poly(A)-binding protein: implications for HYD function. *Journal of Biological Chemistry* **281**(20):14376-14382.
- Ljung L. 1999. System Identification, Theory for the user Prentice Hall PTP: New Jersey.
- Löfas S, Malmqvist M, Rönnberg I, Stenberg E, Liedberg B, Lundström I. 1991. Bioanalysis with surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B: Chemical* **5**(1-4):79-84.
- Lortat-Jacob H, Ricard-Blum S. 1997. Use of plasmon resonance (BIACORE TM) for the analysis of ligand-receptor interactions. . In Morel Gérard, Visualization of receptors: methods in light and electron microscopy. Boca Raton, Floride: CRC Press LLC. p 161-180.
- Lung F-DT, Li WC, Liou C-C. 2006. Surface Plasmon Resonance- and Quartz Crystal Microbalance-based Methods for Detecting GRB2 SH2 / Peptide Interaction.487-488.

- Maeda H, Sahara H, Mori Y, Torigo T, Kamiguchi K, Tamura Y, Tamura Y, Hirata K, Sato N. 2007. Biological heterogeneity of the peptide-binding motif of the 70-kDa heat shock protein by surface plasmon resonance analysis. *J Biol Chem* **282**(37):26956-62.
- Markgren PO, Schaal W, Hamalainen M, Karlen A, Hallberg A, Samuelsson B, Danielson UH. 2002. Relationships between structure and interaction kinetics for HIV-1 protease inhibitors. *J Med Chem* **45**(25):5430-9.
- Mason T, Pineda AR, Wofsy C, Goldstein B. 1999. Effective rate models for the analysis of transport-dependent biosensor data. *Mathematical Biosciences* **159**(2):123-144.
- Mattei B, Borch J, Roepstorff P. 2004. Peer Reviewed: Biomolecular Interaction Analysis and MS. *Analytical Chemistry* **76**(1):18 A-25 A.
- Mehand MS, Srinivasan B. 2012. Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections. *J Mol Recognit* **25**(4):208-215.
- Mehand MS, De Crescenzo G, Srinivasan B. 2012. Increasing throughput of surface plasmon resonance-based biosensors by multiple analyte injections. *J Mol Recognit* **25**(4):208-15.
- Monchaux E, Vermette P. 2007. Development of dextran-derivative arrays to identify physicochemical properties involved in biofouling from serum. *Langmuir* **23**(6):3290-7.
- Monchaux E, Vermette P. 2008. Cell adhesion resistance mechanisms using arrays of dextran-derivative layers. *J Biomed Mater Res A* **85**(4):1052-63.
- Morton TA, Myszka DG, Chaiken IM. 1995. Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation, and Numerical Integration. *Analytical Biochemistry* **227**(1):176-185.
- Myszka DG, Morton TA. 1998. CLAMP©: a biosensor kinetic data analysis program. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(4):149-150.
- Myszka DG. 1999. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* **12**(5):279-84.
- Myszka DG. 2004. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology. *Analytical Biochemistry* **329**(2):316-323.
- Myszka DG, Morton TA, Doyle ML, Chaiken IM. 1997. Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophys Chem* **64**(1-3):127-37.
- Myszka DG, Abdiche YN, Arisaka F, Byron O, Eisenstein E, Hensley P, Thomson JA, Lombardo CR, Schwarz F, Stafford W and others. 2003. The ABRF-MIRG'02 study: assembly state, thermodynamic, and kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction. *J Biomol Tech* **14**(4):247-69.
- Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. 1998. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. *Biophysical Journal* **75**(2):583-594.
- Myszka DG. 1997. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr Opin Biotechnol* **8**(1):50-7.
- Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri Y, Taguch T, Suzuki T, Sekino T, Mimori K, Ebata T, Saito M, Nakao H and others. 2001. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and

- receptor glycolipid Gb3Cer by Surface Plasmon Resonance. *J Biol Chem* **276**(46):42915-22.
- Navratilova I, Papalia GA, Rich RL, Bedinger D, Brophy S, Condon B, Deng T, Emerick AW, Guan H-W, Hayden T and others. 2007. Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **364**(1):67-77.
- Navratilova I, Hopkins AL. 2011. Emerging role of surface plasmon resonance in fragment-based drug discovery. *Future Med Chem* **3**(14):1809-20.
- Nice E, Catimel B. 1999. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays* **21**(4):339-52.
- O'Connor-McCourt MD, De Crescenzo G, Lortie R, Lenferink A, Grothe S. 1998. The analysis of surface plasmon resonance-based biosensor data using numerical integration: the epidermal growth factor receptor-ligand interaction as an example. In: Lundahl P, Lundqvist A, Greiger E, editors. *Quantitative Analysis of Biospecific Interactions*: Harwood academic publishers. p 178-190.
- Önell A, Andersson K. 2005. Kinetic determinations of molecular interactions using Biacore--minimum data requirements for efficient experimental design. *Journal of Molecular Recognition* **18**(4):307-317.
- Ober RJ, Ward ES. 1999. The Influence of Signal Noise on the Accuracy of Kinetic Constants Measured by Surface Plasmon Resonance Experiments. *Analytical Biochemistry* **273**(1):49-59.
- Papalia GA, Baer M, Luehrsen K, Nordin H, Flynn P, Myszka DG. 2006. High-resolution characterization of antibody fragment/antigen interactions using Biacore T100. *Analytical Biochemistry* **359**(1):112-119.
- Pearson J, Hill J, Swank J, Isoherranen N, Kunze K, Atkins W. 2006. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with Kinetic Resolution of Multiple Binding Orientations. *Biochemistry* **45**(20):6341-53.
- Powner ET, Yalcinkaya F. 1997. Intelligent biosensors. *Sensor Review*: MCB UP Ltd. p 107 - 116.
- Reklaitis GV, Ravindran A, Ragsdell KM. 1983. *Engineering Optimization, Methods and Applications*. John Wiley and Sons.: New York.
- Rich RL, Myszka DG. 2001. Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* **14**(5):273-294.
- Rich RL, Myszka DG. 2006. Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* **19**(6):478-534.
- Rich RL, Myszka DG. 2010. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* **23**(1):1-64.
- Rich RL, Myszka DG. 2008. Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* **21**(6):355-400.
- Rich RL, Myszka DG. 2007. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Analytical Biochemistry* **361**(1):1-6.

- Rich RL, Cannon MJ, Jenkins J, Pandian P, Sundaram S, Magyar R, Brockman J, Lambert J, Myszka DG. 2008. Extracting kinetic rate constants from surface plasmon resonance array systems. *Analytical Biochemistry* **373**(1):112-120.
- Rich RL, Myszka DG. 2000. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology* **11**(1):54-61.
- Scarano S, Mascini M, Turner AP, Minunni M. 2010. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosens Bioelectron* **25**(5):957-66.
- Schasfoort R, B M., , Tudos AJ. 2008. Introduction to Surface Plasmon Resonance. In: Schasfoort R, B M., , Tudos AJ, editors. Handbook of Surface Plasmon Resonance. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. p 1-13.
- Schuck P, Minton AP. 1996. Analysis of Mass Transport-Limited Binding Kinetics in Evanescent Wave Biosensors. *Analytical Biochemistry* **240**(2):262-272.
- Schuck P. 1996. Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport. *Biophysical Journal* **70**(3):1230-1249.
- Schwaab M, Luiz Monteiro J, Carlos Pinto J. 2008. Sequential experimental design for model discrimination: Taking into account the posterior covariance matrix of differences between model predictions. *Chemical Engineering Science* **63**(9):2408-2419.
- Shankaran D, Miura K. 2007. Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays. *Journal of Physics D Applied Physics* **40**(23):7187-7200.
- Slepenkov S, Darzynkiewicz E, Rhoads R. 2006. Stopped-flow kinetic analysis of eIF4E and phosphorylated eIF4E binding to cap analogs and capped oligoribonucleotides : Evidence for a one-step binding mechanism. *J Biol Chem* **281**(21):14927-38.
- Stigter ECA, Jong GJd, van Bennekom WP. 2005. An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-[gamma] in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR). *Biosensors and Bioelectronics* **21**(3):474-482.
- Swinney DC. 2009. The role of binding kinetics in therapeutically useful drug action. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**(1):31-9.
- Szabo A, Stolz L, Granzow R. 1995. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Current Opinion in Structural Biology* **5**(5):699-705.
- Tanious FA, Nguyen B, Wilson WD. 2008. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Methods Cell Biol* **84**:53-77.
- Velasco-Garcia MN, Mottram T. 2001. Biosensors in the livestock industry: an automated ovulation prediction system for dairy cows. *Trends Biotechnol* **19**(11):433-4.
- Vijayendran R, Leckband D. 2001. A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins. *Anal Chem* **73**(3):471-80.
- Wade JD, Hojo K, Kawasaki K, Johns TG, Catimel B, Rothacker J, Nice EC. 2006. An automated peptide and protein thiazolidine coupling chemistry for biosensor immobilization giving a unique N-terminal orientation. *Anal Biochem* **348**(2):315-7.

- Wright SJ, Orban D. 2002. Properties of the log-barrier function on degenerate nonlinear programs. *Mathematics of Operations Research* **27**(3):585-613.
- Xia N, Liu L, Harrington MG, Wang J, Zhou F. 2010. Regenerable and simultaneous surface plasmon resonance detection of abeta(1-40) and abeta(1-42) peptides in cerebrospinal fluids with signal amplification by streptavidin conjugated to an N-terminus-specific antibody. *Anal Chem* **82**(24):10151-7.
- Zhou M, Felder S, Rubinstein M, Hurwitz D, Ullrich A, Lax I, Schlessinger J. 1993. Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry* **32**(32):8193-8.

ANNEXE 1 – ESTIMATION DE LA CONCENTRATION D’UN ANALYTE AVEC LES BIOCAPTEURS UTILISANT LE PHÉNOMÈNE DE RÉSONANCE PLASMIQUE DE SURFACE PAR LA TECHNIQUE D’IDENTIFICATION DE PARAMÈTRES.

Présentation de l’article

Cette section reprend l’article intitulé " **Estimation of analyte concentration by surface plasmon resonance-based biosensing using parameter identification techniques**" publié dans le journal « *Analytical Biochemistry* » en 2011. Ce chapitre présente une méthode simple basée sur la technique d’identification de paramètres en connaissant les constantes cinétiques entre le ligand et l’analyte. Cette méthode ne nécessite pas la construction d’une courbe de calibration ce qui réduit drastiquement le temps d’expérience et la consommation de matériel.

Estimation of analyte concentration by surface plasmon resonance-based biosensing using parameter identification techniques

AUTHORS: *Massinissa Si Mehand, Bala Srinivasan and Gregory De Crescenzo**

SUBJECT CATEGORY: *Physical Techniques*

Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal. P.O. Box 6079, Centre-ville

Station, H3C 3A7 Montréal, Québec, Canada

* To whom all correspondence should be sent. Tel: (514) 340-4711 x7428, Fax: (514)-340-2990.

E-mail address: gregory.decrescenzo@polymtl.ca

RUNNING TITLE: Estimation of analyte concentration by SPR

ABSTRACT

Surface plasmon resonance-based biosensors have been applied to the determination of macromolecule concentration. Up to now, the proposed experimental approaches have relied either on the generation of a calibration curve that only exploit few data points from each sensorgram, or on multiple injections of the unknown sample at various flow rates. In this manuscript, we show that prior knowledge of the kinetic parameters related to the interaction of the species with a given partner could advantageously reduce the number of injections that are required by both aforementioned methods, thereby reducing experimental time, while maintaining good level of confidence on the determined concentrations.

KEYWORDS

Surface plasmon resonance (SPR), biosensor, concentration determination, parameter identification, kinetics.

INTRODUCTION

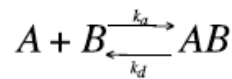
Since the 70's, the biopharmaceutical industry has taken advantage of advances in recombinant protein production and high throughput screening in order to understand the molecular roots of many diseases as well as to develop new therapeutics. Various platforms for recombinant protein production have been developed to satisfy these needs; those include the development and validation of FDA-approved mammalian and plant cell lines, or bacterial systems. In the context of protein production process, product concentration has been suggested to be one of the most important parameter to be routinely measured for process monitoring and control (Baker *et al.*, 2002). In order to determine protein concentration in crude samples, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and, to some extent, fluorescence-based assays are popular off-line quantification methods as they allow for the simultaneous analysis of multiple samples (Birch and Racher 2006), but their implementation remains long and tedious and can only be achieved off-line. As an alternative, surface plasmon resonance-based instruments, including those developed by BIACORE Inc. (now part of GE Healthcare) have been demonstrated to be useful for concentration determination, both off-line (Kikuchi *et al.*, 2005) and at-line (Chavane *et al.*, 2008). Most of the proposed approaches rely on the generation of a calibration curve that only exploits a few data points from each sensorgram; this calibration-dependent approach is often coupled with total or partial mass transfer limitation conditions by increasing ligand densities and working at low flow rates (Chavane *et al.*, 2008; Kikuchi *et al.*, 2005). Furthermore, each quantification campaign or new biosensor surface requires a new calibration to be performed, thus increasing time and material consumption, while making at-line quantification difficult (Chavane *et al.*, 2008). As alternative, calibration-free methods that exploit partial mass transfer limitation have also been proposed (Christensen 1997; Richalet-

Sécordel *et al.*, 1997; Sigmundsson *et al.*, 2002). These methods require several injections at various flow rates for each unknown sample, which makes them suboptimal for at-line measurements.

In this work, we explore an alternative method for the determination of analyte concentration, assuming prior knowledge on its kinetics of interaction with a given partner. The method is based on the injections of samples at unknown concentration, followed by a numerical parameter fitting approach in which concentration is treated as a parameter to be identified. Thus, the approach replaces the calibration step by using prior knowledge of kinetic constants, thereby reducing experimental time. Then, as to the question on how the error in the kinetic parameters would affect the concentration measurements, our results suggest that the analyte concentration can be estimated with a fairly good confidence, i.e., within 10% error.

Theory: modelling of the interaction

When analyte (A) is injected over a biosensor surface where its binding partner (the ligand: B) has been immobilized, their interaction is described by the following scheme:



where k_a and k_d correspond to the association and dissociation rate constants of the interaction, respectively. With SPR optical biosensors such as BIACORE™, the interaction is followed by monitoring AB (in resonance units, RU). The following mathematical model describes the interaction:

$$\begin{aligned} \dot{R}_{AB} &= k_a C_A (R_{\max} - R_{AB}) - k_d R_{AB}, & R_{AB}(0) &= 0 \\ R &= \begin{cases} R_{AB} + R_A, & \text{if } C_A \neq 0 \\ R_{AB}, & \text{if } C_A = 0 \end{cases} \end{aligned} \quad (8.1)$$

Where C_A is the concentration of free A (in M), R_{max} the maximal amount of A that can specifically bind to the surface (in RU), R_{AB} is the amount of AB complex corresponding to the recorded signal (in RU) and R_A is a local correction factor (in RU) that is added to take into account refractive index artifacts that are often observed at the beginning of each phase of a sensorgram even after control correction of the signal. R is the resulting recorded signal in RU. The method is designed with a local correction parameter, R_A , but in this case study, it was observed that $R_A=0$ is optimal; the R_A local parameter was thus removed from the algorithm.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Experimental data were generated with a BIACORE T100 optical biosensor equipped with research-grade CM5 sensor chip (GE Healthcare). HBS-EP buffer and immobilization solutions were purchased from GE Healthcare. Carbonic anhydrase isozyme II (CAII) from bovine erythrocytes, 4-carboxybenzenesulfonamide (CBS) and phosphate buffer saline (PBS, 10 mM, pH 7.4) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON).

Biosensor surface preparation and sample injections: Two CA II surfaces (and their corresponding blank surfaces) were prepared at different densities (6843 and 4250 RU of immobilized CA II) according to published protocols (Navratilova *et al.*, 2007). CBS sample injections were carried out in duplicate at a flow rate of 100 μ l/min, at 24, 18, 12 and 6°C. All CBS samples were diluted in HBS-EP buffer from a stock solution (1.56 mM) prepared in PBS buffer.

Data analysis: For concentration analysis, an in-house software package was developed with the MATLAB 7.7.0.471 (R2008b) software platform (The Mathworks, Natick, USA) using the kinetic model described in (8.1). The least-square problems presented below were solved with the standard simplex program available in the optimization Toolbox 4.1 of MatLab.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental data collection and kinetic analysis

We hypothesized that a numerical strategy relying on prior knowledge of kinetic constants would be as efficient, if not more, as a traditional calibration-based approach for the determination of analyte concentrations (values and related standard deviation) in an SPR-based biosensor approach. This hypothesis was tested experimentally by recording sets of sensorgrams corresponding to the interactions of a small molecular weight compound (CBS, the analyte) with its binding partner (CAII) that had been immobilized on biosensor surfaces. This biological system was selected since *i*) it has already been extensively studied by SPR and demonstrated to follow a simple kinetic model (Day *et al.*, 2002; Navratilova *et al.*, 2007) and *ii*) varying the temperature has been shown to affect both association and dissociation rates, thus, providing us with the opportunity to test our hypothesis for different scenarios (Table 8.1).

In a first step, classical kinetic experiments were performed by injecting CBS over CAII surfaces at two different densities and at various temperatures (24, 18, 12 and 6°C). These sets of sensorgrams were globally analyzed using a simple model available in Biaevaluation 1.1.1 (Figure 1 and data not shown). Excellent fits were obtained for temperatures ranging from 12 to 24°C (Figure 1 and data not shown). At these temperatures, the resulting kinetic constants were in excellent agreement with those previously determined (less than 10% difference, Table 8.1). At 6°C, the experimental data were not as good-quality as for other temperatures (Figure 8.1) and bigger variations in k_a values, when compared to that previously determined, were observed (29 and 18% variations for high and low density surfaces respectively, Table 8.1). These sets of sensorgrams were however included in this study since higher variations were reported for a similar biological system that had been investigated in a multiple user campaign (Cannon *et al.*,

2004). At last, in addition to the sensorgrams used for kinetic analysis, three additional CBS injections at 29.53, 3.19 and 1.23 μM were performed in duplicate. The resulting sensorgrams were control-corrected as those related to kinetic analysis, and were considered as sensorgrams resulting from the injections of samples of unknown concentrations for the rest of the study (Figure 1, right panels and data not shown).

Table 8.1. Kinetic constants for CBS/CAII interactions determined from BIACORE analysis.

T ($^{\circ}\text{C}$)	k_a ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)			k_d ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)		
	High density	Low density	Literature	High density	Low density	Literature
24	3.752 ± 0.006	3.729 ± 0.001	3.5	33.590 ± 0.003	32.910 ± 0.005	32
18	2.728 ± 0.006	2.864 ± 0.009	2.6	17.530 ± 0.002	17.720 ± 0.003	16
12	2.364 ± 0.004	2.326 ± 0.006	2.0	8.890 ± 0.009	8.895 ± 0.001	8.2
6	1.920 ± 0.003	1.781 ± 0.004	1.5	4.391 ± 0.005	4.391 ± 0.006	4.3

Determination of the unknown concentrations

Standard calibration curve

The sets of sensorgrams we collected for kinetic analysis were first used to generate standard calibration curves. To improve the accuracy, calibration curves were generated for different time points (1, 2, 4, 5, and 40 s after the start of injections) to calculate the concentration of the three unknown samples by simple interpolation. The relative errors on each concentration at each temperature ranged from 14 to 28% (Table 8.2).

Table 8.2. Summary of the different strategies and related maximal deviations from real values.

Strategies				Max deviation (%)		
	Estimated parameter	Number of unknown samples	Origin of the Kinetic Parameters	1227 nM	3190 nM	29534 nM
Standard calibration curve	C_A	1	-	28%	14%	26%
Strategy A	C_A	1	this study	20%	20%	9%
Strategy B	C_A, R_{max}	3	this study	8%	10%	10%
Strategy C	C_A, R_{max}	3	[8]	10%	7%	8%

Use of R_{max} and kinetic parameters to determine unknown concentrations

As an alternative to standard calibration curve, we then determined the concentration of each unknown sample that had been injected on a given surface by fitting its corresponding sensorgram, using the R_{max} and kinetic constant values that we previously determined with Biaevaluation 1.1.1 software package when investigating CBS/CAII interactions on these surfaces (Table 8.1). This approach thus corresponds to a simple rearrangement exercise of the traditional global fit method aiming at identifying the kinetic parameters and the R_{max} value from sensorgrams corresponding to analyte injections performed at known concentrations. Here, since R_{max} and the kinetic constants are available, then it is possible to determine the concentration C_A by solving the following least square problem:

$$\min_{\theta} \sum_j^M \left(R_{meas}(j) - R_{pred}(j) \right)^2 \quad (8.1)$$

$$\text{with } \theta = [C_A, R_A] \quad (8.2)$$

Where M is the number of data points in the sensorgram, R_{meas} the value of a given data point, R_{pred} its related value predicted from the model presented in equation (8.1).

This approach resulted in a slight improvement on the errors (Table 8.2, strategy A), most likely due to the fact that all data points within each sensorgram are taken into account. This approach is however as time-consuming as the use of a standard calibration curve.

Use of kinetic parameters only to determine unknown concentrations

We then reasoned that the above approach would be further improved if prior knowledge of R_{max} was not necessary. Indeed, if such was the case, and assuming prior knowledge of the kinetic parameters (from previous studies), one would only need to perform a single injection for each unknown sample without any time-consuming calibration step for each new ligand surface. So, in contrast to the classical calibration approach and to the rearrangement exercise we just tested, the necessity of calibration could be eliminated if R_{max} was included in the parameter vector θ . Preliminary attempts aiming at determining each unknown sample concentration individually gave values with relative errors ranging from 28 to 50 % (data not shown). This poor performance is most likely due to the fact that R_{max} and C_A are multiplied in eq. (8.1). We then reasoned that the errors on the concentration could be improved by globally fitting the sensorgrams corresponding to multiple unknown sample injections. Our reasoning was based on the observation that, for kinetic experiments, the confidence on kinetic parameters has been reported to improve when globally fitting multiple sensorgrams corresponding to different analyte concentrations (De Crescenzo *et al.*, 2008; Ö'nell and Andersson 2005). For each temperature and surface, we then globally fitted the 3 sensorgrams corresponding to the unknown sample injections. In this endeavour, R_{max} was considered as a global parameter to be identified

while C_{Ai} s were considered to be local parameters. Kinetic constants were considered as known parameters and the identification problem was formulated as follows:

$$\min_{\theta} \sum_i^3 \sum_j^M (R_{meas}^i(j) - R_{pred}^i(j))^2, \quad \theta = [C_{Ai}, R_{max}, R_{Ai}] \quad (8.3)$$

Note that C_{Ai} s were considered as independent variables, as if one would aim at identifying the concentrations of unknown samples being totally independent from each other. Identification was judged excellent, as deviations from real concentrations were less than 10% (Table 8.2, strategies B and C) whether we used the kinetic constants we determined in this study or we extracted from previous work by Navratilova (Navratilova *et al.*, 2007), respectively. This result was expected since, among the 3 sensorgrams used for concentration determination, a steady state-equilibrium value close to R_{max} was reached when injecting the less diluted sample. In order to explore all possible scenarios one may face when applying this approach to real cases, the same type of analysis was performed but considering the concentration of the less diluted sample as known (i.e., as if a single injection of standard at high concentration had been performed in order to help the identification of all the other concentrations). In that case, the same deviations from the real concentrations (less than 10%) were observed as with strategies B and C.

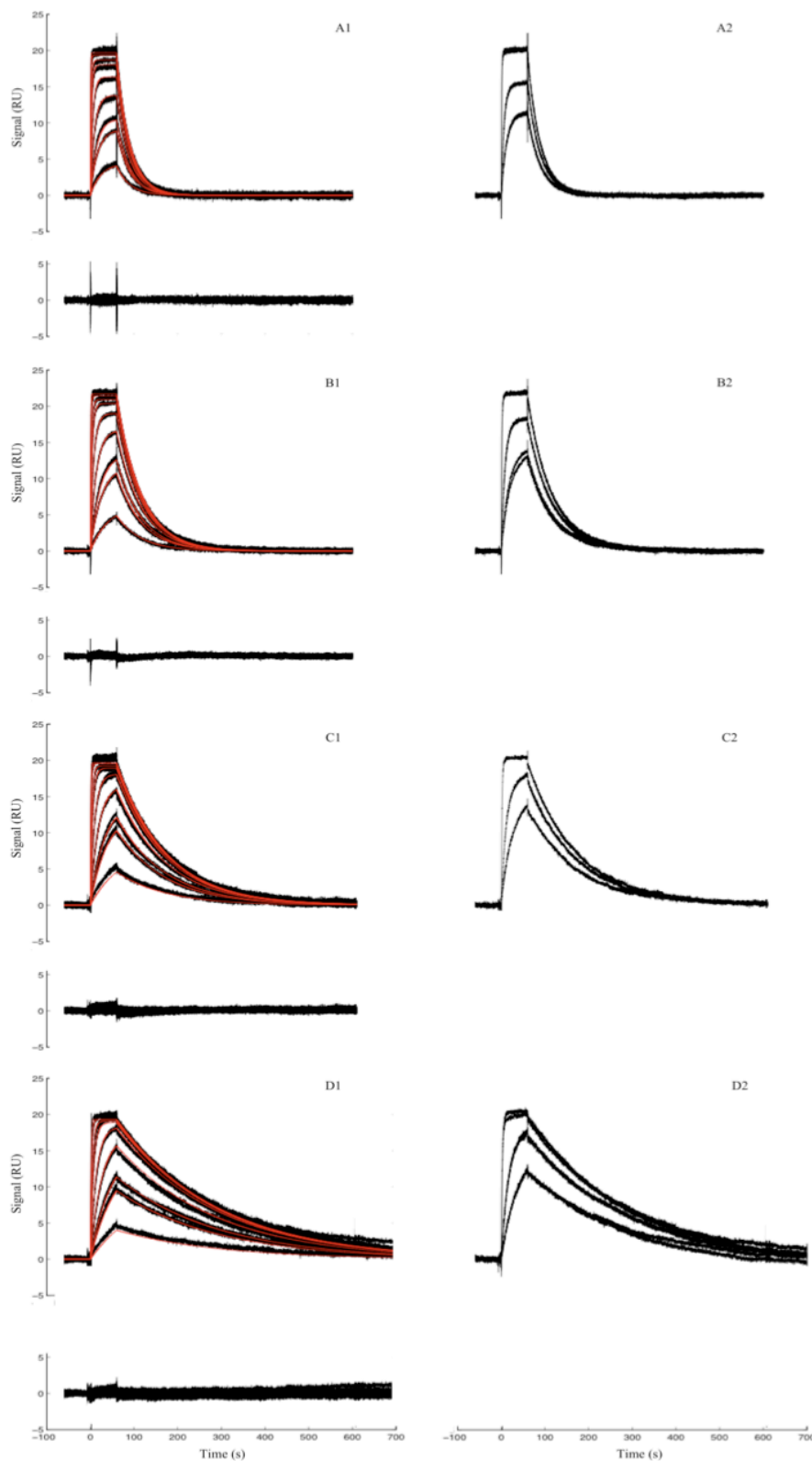


Figure 8.1. Kinetic analysis of CBS binding to CA II surfaces. Panels A1 to D1: Black dots correspond to control-corrected and double referenced sensorgrams collected at different temperatures (from A to D: 24, 18, 12 and 6°C, respectively) when injecting CBS (from 249 nM to 49.091 μ M) across a CAII surface (4250 RU). Red lines correspond to the global fits with a simple model. The residuals are presented below each set of sensorgrams. Panels A2 to D2: Double-referenced sensorgrams corresponding to CBS injections at 29.53, 3.19 and 1.23 μ M over the same CAII surface.

CONCLUSION

In this manuscript, we demonstrated that prior knowledge of the kinetic constants related to the interaction of an analyte with a given ligand might be exploited to identify the unknown concentrations of many analyte samples. The various strategies we tested took into account all the experimental data points of each sensorgram, leading to improvement in confidence of the identified concentration, when compared to standard methods relying on calibration curves (see Table 8.2). We also demonstrated that our approach only requires a single standard injection to be performed in order to improve R_{max} and thus C_A identification. Of interest, we also showed that this injection of a standard is not even necessary if at least one unknown sample injection almost lead to surface saturation.

Altogether, our approach reduces time and material consumption and thus experimental costs associated with surface calibration. This makes it ideal for the implementation of routine assays aiming at validating macromolecule concentrations, such as in the case of quality control assessment when many solutions of the same product have to be quantified. Also, in an effort to satisfy the needs of the biopharmaceutical industry for process analytical technologies (PAT), we recently developed an automated method for the monitoring of a given secreted protein by harnessing an SPR biosensor to a bioreactor (Chavane *et al.*, 2008). In that context, we believe that the approach we here report could be advantageously adapted to ease at-line monitoring.

ACKNOWLEDGEMENTS

GDC is a Canada Research Chairholder (CRC on Protein-enhanced Biomaterials, tier 2 level). This research was supported by FQRNT (GDC) and NSERC (BS) grants.

References

- Baker KN, Rendall MH, Patel A, Boyd P, Hoare M, Freedman RB, James DC. 2002. Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies. *Trends in Biotechnology* **20**(4):149-156.
- Birch JR, Racher AJ. 2006. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**(5-6):671-685.
- Cannon MJ, Papalia GA, Navratilova I, Fisher RJ, Roberts LR, Worthy KM, Stephen AG, Marchesini GR, Collins EJ, Casper D and others. 2004. Comparative analyses of a small molecule/enzyme interaction by multiple users of Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **330**(1):98-113.
- Chavane N, Jacquemart R, Hoemann CD, Jolicoeur M, De Crescenzo G. 2008. At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analytical Biochemistry* **378**(2):158-165.
- Christensen LLH. 1997. Theoretical Analysis of Protein Concentration Determination Using Biosensor Technology under Conditions of Partial Mass Transport Limitation. *Analytical Biochemistry* **249**(2):153-164.
- Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszka DG. 2002. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Science* **11**(5):1017-1025.
- De Crescenzo G, Woodward L, Srinivasan B. 2008. Online optimization of surface plasmon resonance-based biosensor experiments for improved throughput and confidence. *Journal of Molecular Recognition* **21**(4):256-266.
- Kikuchi Y, Uno S, Nanami M, Yoshimura Y, Iida S-i, Fukushima N, Tsuchiya M. 2005. Determination of concentration and binding affinity of antibody fragments by use of surface plasmon resonance. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**(3):311-317.
- Navratilova I, Papalia GA, Rich RL, Bedinger D, Brophy S, Condon B, Deng T, Emerick AW, Guan H-W, Hayden T and others. 2007. Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Analytical Biochemistry* **364**(1):67-77.
- Önell A, Andersson K. 2005. Kinetic determinations of molecular interactions using Biacore--minimum data requirements for efficient experimental design. *Journal of Molecular Recognition* **18**(4):307-317.
- Richalet-Sécorde PM, Rauffer-Bruyère N, Christensen LLH, Ofenloch-Haehnle B, Seidel C, Van Regenmortel MHV. 1997. Concentration Measurement of Unpurified Proteins Using Biosensor Technology under Conditions of Partial Mass Transport Limitation. *Analytical Biochemistry* **249**(2):165-173.
- Sigmundsson K, Masson G, Rice R, Beauchemin N, Obrink B. 2002. Determination of Active Concentrations and Association and Dissociation Rate Constants of Interacting Biomolecules: An Analytical Solution to the Theory for Kinetic and Mass Transport

Limitations in Biosensor Technology and Its Experimental Verification. *Biochemistry* **41**(26):8263-8276.